

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Producción Animal



TESIS DOCTORAL

**Nutrigenómica de la tilapia, (*Oreochromis niloticus*) alimentada con
diferentes fuentes de ácidos grasos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Isabel Tupac Yupanqui Sagástegui

Directores

Susana Dunner Boxberger
Óscar Cortés Gardyn

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria



NUTRIGENÓMICA DE LA TILAPIA

(*Oreochromis niloticus*)

**ALIMENTADA CON DIFERENTES FUENTES DE
ÁCIDOS GRASOS**

Memoria presentada por B. Isabel Tupac Yupanqui Sagástegui para optar al grado de Doctor, realizada en el Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y dirigida por la Dra. Susana Dunner Boxberger y el Dr. Oscar Cortés Gardyn.

A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Susana Dunner y Oscar Cortés, directores de este trabajo, haber hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

De la misma manera agradecer a Morris Villarroel, profesor de la Universidad Politécnica de Madrid de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, por su apoyo constante durante la investigación, a las instituciones que me han permitido la realización del estudio, como el Ministerio de Educación y Ciencia por el financiamiento del proyecto. Al Grupo de Investigación de Recursos Acuícolas de la Universidad Politécnica de Valencia por el suministro de pienso, a Valenciana de Acuicultura por el suministro de los alevines de tilapia y a la Universidad Complutense de Madrid.

Igualmente, les doy las gracias a los compañeros del Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria de la U.C.M. por todos los momentos que hemos pasado en este lugar de trabajo.

Sobre todo, mi mayor agradecimiento a mi familia y amigos, que me han apoyado y animado día a día, sin ellos no hubiese podido llevar a cabo este proyecto profesional y personal.

Y finalmente a mi madre, que nunca perdió la esperanza en mí y que me acompaña día a día, esto va por ti, mamá!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	VII
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	XIII
ABREVIATURAS	XIX
RESUMEN – ABSTRACT	XXIII
1. INTRODUCCION	
1.1. Acuicultura	3
1.1.1. Tilapia: Distribución geográfica, Importancia y Taxonomía	4
1.1.2. La Tilapia como modelo animal	6
1.1.3. Avances en la genómica de especies acuícolas	7
1.2. Nutrición en Acuicultura	10
1.2.1. Las fuentes de grasa en la alimentación	13
1.2.2. Los ácidos grasos	13
1.2.2.1. Estructura química	15
1.2.2.2. Nomenclatura	15
1.2.2.3. Clasificación	19
1.2.2.4. Biosíntesis de los Ácidos Grasos	22
1.2.2.5. Oxidación de los Ácidos Grasos	25
1.2.3. Importancia de los Ácidos Grasos Poliinsaturados ($\omega 3$ y $\omega 6$)	27
1.2.4. Requerimientos de ácidos grasos en peces de agua dulce y marina	30
1.2.5. Fuentes alternativas al aceite de pescado en piensos para Acuicultura	31
1.3. Nutrigenómica y Nutrigenética	34
1.3.1. Influencia del estrés en la Expresión Génica	35
1.3.2. Influencia de la dieta en la Regulación de la Expresión Génica	37
1.3.3. Los ácidos grasos poliinsaturados en la expresión de los genes	38
1.3.4. Técnicas para la detección de la Expresión Génica	39
1.3.4.1. <i>Differential Display</i>	39

1.3.4.2. PCR a tiempo real	41
1.3.4.3. qRT-PCR	42
2. OBJETIVOS	47
3. MATERIAL Y MÉTODOS	51
3.1. Experimento 1: Influencia de la frecuencia de alimentación en la Expresión Génica	51
3.1.1. Material Biológico	51
3.2. Experimento 2: Influencia de los ácidos grasos poliinsaturados en la Expresión Génica	52
3.2.1. Material Biológico	52
3.3. Extracción, valoración y conservación de ARN	53
3.4. <i>Differential Display</i>	54
3.4.1. Reacción de Retrotranscripción	55
3.4.2. Amplificación del cDNA	56
3.4.3. Electroforesis en geles de acrilamida	59
3.4.4. Tinción y Revelado	59
3.4.5. Selección de las bandas diferencialmente expresadas.....	60
3.4.6. Reamplificación de las bandas diferenciales.....	61
3.4.7. Secuenciación y purificación de la PCR de secuenciación.....	62
3.4.8. Análisis de las secuencias e identificación de genes diferencialmente expresados.	64
3.5. qRT-PCR Cuantitativa	66
3.5.1. Genes cuantificados: Diseño de cebadores	64
3.5.2. Construcción de la recta patrón	68
3.5.3. Genes de Referencia	69
3.5.4. Análisis de Datos	69

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1: Influencia de la frecuencia de alimentación en la Expresión Génica.....	73
4.1.1. Expresión diferencial detectada en muestras de Cerebro por <i>Differential Display</i>	73
4.2. Experimento 2: Influencia de los ácidos grasos poliinsaturados en la Expresión Génica	75
4.2.1. <i>Differential Display</i>	75
4.2.1.1. Muestras de músculo	75
4.2.1.2. Muestras de hígado	77
4.2.2. Expresión diferencial detectada por qRT-PCR	78
4.2.2.1. Genes candidatos implicados en el metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados: ACLY, FAS, ME, ELOVL6, SCD, FAD6, ACSL1, ECH1, APOA1, SREBP1, PPARα, HNF-4 y USF1.....	78
4.2.2.2. Genes relacionados con el estrés: KRL, HSP70, HSP90 PRLPR, GH, IGF-I, IGF-II.....	84

5. DISCUSIÓN

5.1. Experimento 1: Influencia de la frecuencia de alimentación en la Expresión Génica.....	91
5.1.1. Expresión diferencial en muestras de cerebro	91
5.2. Experimento 2: Influencia de los ácidos grasos poliinsaturados en la Expresión Génica.....	94
5.2.1. Expresión diferencial en muestras de músculo	94
5.2.2. Expresión diferencial en muestras de hígado	95
5.2.3. Expresión diferencial detectada por qRT-PCR.....	96
5.2.3.1. Genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados.....	96

5.2.3.2. Genes relacionados con el estrés.....	105
6. CONCLUSIONES	111
7. BIBLIOGRAFÍA	115
8. ANEXOS	147

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Introducción

Figura 1.1. Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i> L.)	5
Figura 1.2. Estructura química de los ácidos grasos	15
Figura 1.3. Estructura del ácido Linolénico mostrando los sistemas de nomenclatura	16
Figura 1.4. Estructura química y nomenclatura de los principales ácidos grasos.	18
Figura 1.5. Ruta de la elongación y desaturación de los ácidos grasos.....	24
Figura 1.6. Secuencia enzimática de la β -oxidación.	26
Figura 1.7. Gel de poliacrilamida: <i>Differential Display</i>	40

3. Material y Métodos

Figura 3.1. Electroforesis en agarosa al 1,5%.	53
Figura 3.2. Geles <i>Differential Display</i> RT-PCR en gel al 6% de poliacrilamida teñido con nitrato de plata.....	60
Figura 3.3. qRT-PCR: (A) Recta patrón y (B) Curva de disociación del gen <i>EEF1</i> obtenida por diluciones seriadas de ADNc.	68

4. Resultados

Figura 4.1. Efecto de la dieta de aceite de lino en la expresión génica de <i>O. niloticus</i> en tejido hepático.	79
Figura 4.2. Efecto de la dieta de aceite de girasol en la expresión génica de <i>O. niloticus</i> en tejido hepático	80
Figura 4.3. Efecto de la dieta de aceite de girasol alto oleico en la expresión génica de <i>O. niloticus</i> en tejido hepático.	81
Figura 4.4. Expresión génica por RT-PCR en tejido hepático de <i>O. niloticus</i> por efecto de la dieta de aceite de Lino.....	84
Figura 4.5. Expresión génica por RT-PCR en tejido hepático de <i>O. niloticus</i> por efecto de la dieta de aceite de Girasol.	85

Figura 4.6. Expresión génica por RT-PCR en tejido hepático de <i>O. niloticus</i> por efecto de la dieta de aceite de Girasol alto oleico.....	86
--	----

5. Discusión

Figura 5.1. Participación de la enzima ATP citrato liasa y ácido graso sintasa en el metabolismo de los ácidos grasos.....	99
Figura 5.2. Esquema de las etapas de la formación de los grasos monoinsaturados (MUFA).	101
Figura 5.3. Esquema de la elongación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA).....	103

ÍNDICE DE TABLAS

1. Introducción

Tabla 1.1 Nomenclatura de los principales ácidos grasos.	17
---	----

Modificada de Calder & Field, 2002

3. Material y Métodos

Tabla 3.1. Distribución de peces según la frecuencia de alimentación.	51
--	----

Tabla 3.2. Distribución de peces según las dietas experimentales.	52
--	----

Tabla 3.3. Pooles de ARN según la frecuencia de alimentación y tanques de procedencia.	54
--	----

Tabla 3.4. Pooles de ARN según el tipo de ácido graso de la dieta.	55
---	----

Tabla 3.5. Protocolo de la reacción de transcripción inversa.....	55
---	----

Tabla 3.6. Programa de amplificación de la reacción de transcripción inversa.	55
---	----

Tabla 3.7. Secuencias de los cebadores poli-T utilizados en <i>Differential Display</i>	56
--	----

Tabla 3.8. Secuencias de los cebadores arbitrarios utilizados en <i>Differential Display</i>	57
--	----

Tabla 3.9. Concentración inicial, concentración final y volúmenes de la reacción de amplificación.	58
--	----

Tabla 3.10. Protocolo de amplificación de RT-PCR para <i>Differential Display</i>	58
---	----

Tabla 3.11. Concentración inicial, concentración final y volúmenes de la reacción de reamplificación.	61
---	----

Tabla 3.12. Protocolo de la reacción de reamplificación.	62
---	----

Tabla 3.13. Condiciones de la reacción de secuenciación.....	62
--	----

Tabla 3.14. Programa de la reacción de secuenciación.....	63
---	----

Tabla 3.15. Concentración inicial, concentración final y volúmenes de la PCR.	65
---	----

Tabla 3.16. Programa de amplificación de la PCR cuantitativa.	65
Tabla 3.17. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de genes funcionales.	67

4. Resultados

Tabla 4.1. Resultados de anotación de las secuencia recortadas y Reamplificadas para su identificación en muestras de cerebro de <i>O. niloticus</i>	74
Tabla 4.2. Resultados de anotación de las secuencia recortadas y Reamplificadas para su identificación en muestras de músculo de <i>O. niloticus</i>	76
Tabla 4.3. Resultados de anotación de las secuencia recortadas y Reamplificadas para su identificación en muestras de hígado de <i>O. niloticus</i>	77
Tabla 4.4. Expresión relativa por RT-qPCR en tejido hepático de <i>O. niloticus</i> (tilapia) en peces alimentados con aceites vegetales frente a los alimentados con aceite de pescado.....	83
Tabla 4.5. Expresión relativa por RT-qPCR en tejido hepático de <i>O. niloticus</i> de genes relacionados con el estrés.	87

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ACC	<i>Acetyl-CoA Carboxylase</i>
AcG	Aceite de Girasol
AcGAO	Aceite de Girasol alto oleico
AcL	Aceite de Lino
AcP	Aceite de Pescado
ADNc	ADN complementario
AL	Ácido linoleico
ALN	Ácido linolénico
AO	Ácido oleico
BAC'S	Cromosomas Artificiales de Bacterias (BAC's)
cDNA	DNA complementario
Ct	Ciclo Umbral (<i>Threshold Cycle</i>)
DD	<i>Differential Display</i>
DHA	<i>DocosaHexaenoic Acid</i> , Ácido docosahexaenoico
DPA	<i>DocosaPentaenoic Acid</i> , Ácido docosapentaenoico
Ensembl	EMBL - <i>European Bioinformatics Institute (EBI)</i> y <i>Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI)</i>
EPA	<i>EicosaPentaenoic Acid</i> , Ácido eicosapentaenoico
EST's	Fragmentos cortos de ADNc
FAD5	<i>Delta-5-desaturasa</i>
FAD6	<i>Delta-6-desaturasa</i>
FAS	Ácido graso sintasa
GH	Hormona de crecimiento
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HNF-4	<i>Hepatic nuclear factor 4</i>
HUFA	Ácidos grasos altamente poliinsaturados
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IGF-I	Factor de crecimiento insulínico tipo 1

IGF-II	Factor de crecimiento insulínico tipo 2
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LXR	<i>Liver X receptor</i>
mRNA	RNA mensajero
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
NCBI	<i>National Centre of Biotechnology Information</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPAR	Receptores activados proliferadores de peroxisomas
PUFA	Ácidos grasos poli-insaturados
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
qRT-PCR	<i>quantitative RetroTranscription-Polymerase Chain Reaction</i>
RT	<i>RetroTranscription</i>
RT-PCR	<i>RetroTranscription-Polymerase Chain Reaction</i>
SCD	<i>Stearoyl CoA desaturase 1</i>
SFA	Ácidos grasos saturados
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SREBP1	Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides
TBE	Tris Borato EDTA
TIGR	<i>The Institute of Genomic Research</i>
T _m	<i>melting Temperature</i>
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
USF	<i>Upstream Transcription Factor</i>

RESUMEN / ABSTRACT

RESUMEN

El pescado es uno de los productos alimenticios básicos más comercializados en el mundo y desempeña un papel importante en la seguridad alimentaria y nutritiva, por ser una fuente de ácidos grasos omega 3 de cadena larga (EPA y DHA). El creciente interés por esta fuente de ácidos grasos ha incrementado su precio y, con ello, los costos de producción en la acuicultura. Todo esto ha llevado a la búsqueda de nuevas fuentes alternativas de ácidos grasos omega 3 de cadena larga para reemplazarlos.

El objetivo de esta tesis fue investigar los efectos producidos en el metabolismo de los ácidos grasos y en los procesos de estrés en la Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), al sustituir el aceite de pescado (fuente de ácidos grasos omega-3 de cadena larga) de su dieta por aceites vegetales (aceite de lino, aceite de girasol y aceite de girasol alto-oleico).

Utilizando muestras de cerebro, músculo e hígado, se evaluaron los perfiles de expresión génica por Differential Display y la expresión relativa de genes candidatos mediante RT-PCR cuantitativa. Los resultados mostraron que las dietas basadas en aceites vegetales produjeron un aumento significativo en la expresión de genes que participan en la elongación y desaturación de los ácidos grasos (que permiten la conversión de ácidos grasos esenciales linoleico y linolénico en PUFA de cadena larga: AA, EPA y DHA) y una disminución en la expresión de enzimas que se activan en situaciones de estrés por osmorregulación, choque térmico y respuesta inmune.

Estos resultados aportan una prueba más de que es posible sustituir el aceite de pescado por aceites vegetales en la dieta de Tilapia del Nilo, sin generar efectos negativos en el bienestar animal.

ABSTRACT

Fish is one of the most traded food commodity in the world and plays an important role in food and nutrition security, as a source of omega-3 fatty acids (n-3 HUFAs, including EPA and DHA). The growing interest in this source of fatty acids has increased its price and thereby production costs in aquaculture. All this has led to the search for alternative sources of omega-3 fatty acids to replace them.

The aim of this thesis was to investigate the effects on the metabolism of fatty acids and the processes of stress in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*), by replacing fish oil (source of omega-3 fatty acids) from their diet with vegetable oils (linseed oil, sunflower oil and high-oleic sunflower oil).

Using samples of brain, muscle and liver, gene expression profiles were evaluated by *Differential Display*, and relative expression of candidate genes by quantitative RT-PCR. The results showed that the vegetable oil-based diets produced a significant increase in the expression of genes involved in the elongation and desaturation of fatty acids (which allow the conversion of linoleic and linolenic essential fatty acids in HUFA: AA, EPA and DHA) and a decrease in the expression of enzymes which are activated under stress by osmoregulation, thermal shock and immune response.

These results provide further evidence that it is possible to replace fish oil by vegetable oils in the diet of Nile Tilapia, without any adverse effects on animal welfare.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN:

En el siglo XXI se han desarrollado importantes avances en nutrición, salud y genética; áreas de estudio como genética nutricional, nutrigenética y nutrigenómica, estudian las interacciones entre la dieta y la genética y los mecanismos que intervienen en ella (Ordovás y Corella, 2004; Ulloa y col., 2011). Las enfermedades de origen genético dependen de una compleja interacción entre el genoma humano y factores ambientales y conductuales. Utilizando la información molecular que se tiene a la fecha sobre los procesos biológicos, se está adquiriendo conocimientos sobre la interacción entre genes y su activación o bloqueo, como las proteínas influyen en los procesos metabólicos y los factores que participan en eventos moleculares. Gracias a todos estos nuevos avances y los diversos enfoques genéticos multidisciplinarios, se ha dado paso al desarrollo de nuevas disciplinas basadas en la alimentación y la nutrición ya que resulta imposible agrupar y explicar los procesos moleculares que gobiernan la salud en una sola disciplina.

La Nutrigenética, Nutrigenómica, Proteómica, Metabolómica y Transcriptómica, por tanto, son ciencias emergentes que estudian las relaciones entre salud, nutrición y herencia genética desde enfoques distintos.

1.1. Acuicultura

La acuicultura es un término amplio que engloba las actividades de producción, desarrollo y comercialización de organismos acuáticos, animales o vegetales de aguas dulces o saladas (Barnabe, 1990). Según la FAO “La acuicultura es la cría y cultivo de los organismos acuáticos, ya sean peces, moluscos, crustáceos o plantas acuáticas. El cultivo implica algún tipo de intervención en el proceso para incrementar la producción, por ejemplo el almacenamiento regular, la alimentación, la protección contra los depredadores, etc. El cultivo implica también la propiedad individual o colectiva del stock explotado.” (FAO, 1999).

Es el sector de mayor crecimiento en la producción de alimento, responsable de cerca del 50% de la oferta mundial del pescado (FAO, 2006). En las últimas tres décadas (1980-2010), la producción mundial de peces comestibles procedentes de la acuicultura se ha multiplicado por 12. En el año 2010, la producción acuícola alcanzó un máximo histórico de 60 millones de toneladas destinadas casi en su totalidad al consumo humano (FAO, 2012).

1.1.1. Tilapia: Distribución geográfica, Importancia y Taxonomía.

Las tilapias son endémicas de África, Jordania e Israel y se han descrito más de 70 especies (McAndrew, 2000; Froese y Pauly, 2010), sin embargo, son sólo 9 las especies que cuentan con importancia trascendente en la acuicultura (FAO, 2004). Los géneros *Oreochromis*, *Tilapia* y *Sarotherodon* son los más conocidos (McAndrew, 2000), según Trewavas (1983), esta división se basa principalmente en sus hábitos reproductivos. En el caso del género *Oreochromis sp.*, son las hembras las que exclusivamente incuban en la cavidad bucal sus huevos, a diferencia de los otros dos géneros. La mayor parte de tilapia del género *Oreochromis* se encuentra en África y en menor medida en Asia, desde donde se han introducido a otras partes del mundo en agua dulce y salobre. Se les considera como peces omnívoros ya que son capaces de alimentarse de fitoplancton, perifiton, zoobentos, zooplancton, detritus, y partículas suspendidas ricas en micro algas y detritos (Dempster y col., 1993; Azim y col., 2003; Rakocy, 2006).

En Europa, el Reino Unido es el principal mercado de la tilapia, aunque también se comercializa en Francia, Bélgica, Alemania, Holanda y en menor cantidad en España. Aunque gran cantidad de la tilapia que se comercializa en Europa proviene de las importaciones, algunos países como Bélgica, Reino Unido, Francia, Alemania, Noruega y Dinamarca se dedican a su producción y cultivo (FAO, 2004). Si bien es cierto que en un principio, la tilapia fue considerada por la acuicultura como un medio para producir proteína barata por su tolerancia a aguas de baja calidad, corto ciclo reproductivo y por ser omnívoro (Ali y Al-Asgah, 2005), en la actualidad, la tilapia ha llegado a ser el tercer grupo más importante de peces cultivados, tras las especies de carpa y salmón, gracias

a sus extraordinarias cualidades como crecimiento acelerado, tolerancia a densidades poblacionales, adaptación al cautiverio o resistencia a enfermedades (FAO, 2010).

Dentro del género *Oreochromis*, las especies más comerciales son la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), la tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) y la tilapia azul (*Oreochromis aureus*). La tilapia del Nilo (Figura 1.1) es la especie de tilapia más cultivada (más del 80% de la producción total) (Hempel, 2002), y responsable de un aumento significativo en la producción mundial de la acuicultura ya que ha contribuido con 1.27 MTM en el año 2000 y en un 3,57% de la producción de la acuicultura mundial (Fitzsimmons, 2003; Gupta y Acosta, 2004).



Figura 1.1. Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.)

1.1.2. La Tilapia como modelo animal.

Los peces son el primer grupo de vertebrados que apareció en el periodo Devónico y representan el grupo de vertebrados más diverso. Presentan un sistema inmune con una alta capacidad de respuesta adaptativa al entorno y alta homología cuando se les compara con el sistema inmune de los mamíferos, por ejemplo, muchas componentes del sistema inmune en mamíferos como macrófagos, linfocitos B y T, receptores, macrófagos, citokinas, vías de interferón, etc, se encuentran también en peces (Rauta y col., 2012).

La utilización de peces en la experimentación ha aumentado en los últimos años espectacularmente por ser muy apropiado para estudios relacionados con la salud humana, la alimentación y la biotecnología. A partir de la década de los 90, los peces han sido cada vez más utilizados como modelos experimentales en estudios de biomedicina y genómica. En la actualidad, en la mayoría de laboratorios dedicados a la biología del desarrollo y expresión génica se usan como modelo animal y sigue siendo importante su utilización como centinelas o bioindicadores del cambio ambiental.

Entre la gran diversidad de peces existentes, el pez cebra (*Danio rerio*) es el principal elegido como modelo animal en procesos biológicos por su alto grado de semejanza genética y fisiológica con el ser humano en procesos fundamentales, como por ejemplo el cáncer. El pez cebra está propuesto también como un excelente organismo centinela de monitoreo ambiental y como organismo modelo para comprender fenómenos fisiológicos y genéticos de peces.

Considerando algunas de las ventajas que debe tener una especie como “modelo animal”, la tilapia podría ser considerada como tal, ya que es un organismo que se adapta fácilmente al cautiverio (Watanabe y col., 2002), es de crecimiento acelerado y de desarrollo sexual precoz (4 y 6 meses) y un periodo productivo que suele durar entre 6 y 12 meses (Hulata y col., 1986), se adaptan con facilidad a una amplia gama de alimentos, son capaces de tolerar factores estresantes, son poco susceptibles a enfermedades y pueden ser manipuladas genéticamente (Wohlfarth y col., 1990). Entre otras ventajas importantes, podemos mencionar también su alta capacidad de resistencia a condiciones ambientales adversas como por ejemplo su tolerancia a las

bajas concentraciones de oxígeno y a la alta densidad poblacional (Popma y Masser, 1999).

Entre algunos de los trabajos que utilizan a los peces como animal de laboratorio, podemos citar a la tilapia (*Oreochromis niloticus*) y al pez de la india *Wallago attu*, utilizados en estudios de impacto ambiental, para medir el stress oxidativo y la contaminación acuática por metales pesados y contaminantes orgánicos e inorgánicos (Almeida y col., 2002; Pandey y col., 2003; Zagal y Mazmanci, 2011; Abdel-Moneim, y col., 2012). En estudios farmacéuticos, el pez medaka (*Oryzia latipes*) y la tilapia (*Oreochromis niloticus*), han sido utilizados como modelo para evaluar los daños producidos en el organismo por contaminación acuática a causa del ibuprofeno y el diclofenaco (Hong y col., 2007; Ragugnetti y col., 2011). En estudios sobre susceptibilidad a los patógenos y modificación en la expresión de genes en el sistema inmune por efectos de cantidades elevadas de glucocorticoides se utilizó al lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) (Salas-Leiton y col., 2012) y al pez cebra (*Danio rerio*) que ha sido clonado y caracterizado para los estudios de una elongasa con gran actividad C18-20 y una única desaturasa que presenta actividad delta 6 y delta 5 (Tocher y col., 2003).

1.1.3. Avances en la genómica de especies acuícolas.

El desarrollo logrado en el campo de la genómica en peces es notablemente inferior al de otras especies, debido principalmente al superior valor económico y/o científico de estas. Hasta no hace muchos años, la investigación acuícola se centraba principalmente en especies que por sus características servían de organismos modelo, es el caso del pez cebra (*Danio rerio*), fugu (*Takifugu rubripes*) y puffer verde o moteado (*Tetraodon nigroviridis*), utilizados en biología del desarrollo, genómica nutricional y en comparaciones genómicas con humanos (Nusslein-Volhard, 1994; Roest Crollius y col., 2000; Rothenberg, 2001; Robison y col., 2008).

A partir del año 2000, la publicación de los genomas de cinco especies de teleósteos: *Danio rerio* (<http://www.ensembl.org>), *Takifugu rubripes* (Aparicio y col.,

2002), *Tetraodon nigroviridis* (Jaillon y col., 2004), *Oryzias latipes* (Naruse y col., 2000; Kasahara y col., 2007; Ahsan y col., 2008) y *Gasterosteus aculeatus* (Jones y col., 2012), y el desarrollo de la industria piscícola (Bostock y col., 2010), ha motivado un creciente interés en la investigación sobre los genomas de especies de importancia económica en la acuicultura. Las principales investigaciones se han venido centrando en el rendimiento de los caracteres productivos, el impacto ambiental, la resistencia a enfermedades, tolerancia al frío, a la salinidad y a los bajos niveles de oxígeno disuelto (Burridge y col., 2010; Long y col., 2013; Rico y col., 2012; Miranda y col., 2013).

Utilizando las nuevas tecnologías genómicas y los marcadores moleculares, será posible desarrollar estudios poblacionales de especies en peligro de extinción, aplicar la selección asistida por marcadores (MAS), desarrollar mapas genéticos y de ligamiento, identificar el loci para una característica cuantitativa (QTL) de importancia económica, el diagnóstico y desarrollo de vacunas, la identificación de secuencias de organismos transgénicos y la selección de cultivos y trazabilidad de los peces y sus derivados (Liu, 2007).

Entre las principales especies comerciales estudiadas tenemos al salmón del atlántico (*Salmo salar*) (Rise y col., 2004; Thorsen y col., 2005; Davidson y col., 2010; Leong y col., 2010; Lien y col., 2011), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Rexroad III y col., 2008; Govoroun y col., 2006; Guyomard y col., 2006; Genet y col., 2011), pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Li y col., 2007; Xu y col., 2007), dorada (*Sparus auratus*) (Franch y col., 2006; Senger y col., 2006; Sarropoulou y col., 2007; Kuhl y col., 2011), lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Whitaker y col., 2006; Chistiakov y col., 2008), y el bagre (*Ictalurus punctatus*) (Liu, 2003) (Ulloa y col., 2011; Zhang y col., 2013).

Dentro del grupo de los peces, es importante mencionar a los Cíclidos y entre ellos tres géneros de *Oreochromis* sobre los que se está centrando los estudios genómicos: *O. niloticus*, *O. aureus* y *O. mossambicus*. Estas tilapias, se utilizan como modelos en estudios de biología de la evolución gracias a su diversidad morfológica, comportamiento y ecología. Además, destacan también por ser especies extensamente cultivadas en acuicultura debido a su rápida adaptación a diversos ambientes, medios

de cultivo, tolerancia a situaciones de estrés, salinidad elevada y baja cantidad de oxígeno.

Los estudios genómicos en tilapia han proporcionado hasta la fecha mapas genéticos basados en microsatélites (Kocher y col., 1998; Lee, y col., 2005; Liu y col., 2013), mapas físicos basados en huellas digitales BAC (Katagiri y col., 2005; Soler y col., 2010), la secuencia del ADN mitocondrial (He, y col., 2011) y secuencias expresadas (expressed sequence tag -EST) (Lee y col., 2010). En febrero del 2012, utilizando el ADN de una línea de tilapia desarrollada en el Instituto de Acuicultura de la Universidad de Stirling, los científicos del Broad Institute of Cambridge secuenciaron con éxito el genoma completo de tilapia del Nilo. Este es la primera especie de pez de cultivo comercial que tiene su genoma secuenciado (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AERX000000000>).

En la actualidad, se están desarrollando microarrays para el estudio de los cambios de expresión génica en respuesta a factores ambientes que incluyan estrés, temperatura, salinidad, enfermedades y contaminantes ambientales (Byon 2005; Aoki y col., 2010; Bougas y col., 2013; Christiansen y col., 2013).

1.2. Nutrición en Acuicultura

La producción mundial del cultivo de especies acuáticas comestibles en el año 2010 fue de 59,9 millones de toneladas, lo cual supuso un aumento de un 7,5% con respecto a los 55,7 millones de toneladas en el año 2009. Teniendo en cuenta el ritmo al que crece la población, en el año 2020 se estima que el mundo necesitará incrementar su producción mundial de alimentos acuáticos en 23 millones de toneladas para mantener el nivel actual de consumo per cápita. Este suministro complementario deberá provenir de la acuicultura. La satisfacción de la futura demanda de alimentos de la acuicultura dependerá en gran parte de la disponibilidad de piensos de calidad en las cantidades necesarias. El estudio sobre la disponibilidad y el uso de ingredientes de piensos acuícolas se centra a menudo en los recursos de harina y aceite de pescado (incluido el pescado de bajo valor), aunque considerando las tendencias pasadas y las predicciones para el futuro, resulta más probable que la sostenibilidad del sector acuícola dependa estrechamente del suministro constante de fuentes de carbohidratos, aceites y proteínas de animales y plantas terrestres para piensos acuícolas (FAO, 2012).

Una dieta, en líneas generales, se considera como “ideal” si cubre todos los requerimientos necesarios para mantener la salud de los individuos. Debe proveer energía para cubrir los procesos metabólicos de tal forma que permita el crecimiento y la reproducción óptima del individuo, debe producir efectos que permitan generar resistencia al stress y a las enfermedades y finalmente, el gasto de energía requerido para su adquisición, ingestión, digestión y asimilación debe ser el mínimo posible (Trichet 2010; Oliva-Teles, 2012). Por el contrario, el consumo de una dieta inadecuada conllevará a una reducción o cese del crecimiento y una pérdida de peso de los organismos que puede verse reflejada en una variedad de respuestas fisiológicas y patológicas (Robaina y Schuchardt, 2009).

Los peces, en estado silvestre tienen a su disposición una amplia y variada gama de nutrientes, sin embargo, los peces cultivados obtendrán los nutrientes a partir de los piensos o dietas, la cual deberá contar con los nutrientes y la energía necesaria para lograr una nutrición equilibrada que permita el adecuado crecimiento del cultivo

(Robaina y Schuchardt, 2009). Toda dieta que se le suministre al cultivo de peces deberá ser formulada teniendo en cuenta los cinco grupos de nutrientes: vitaminas, minerales, carbohidratos, lípidos y proteínas. La concentración de éstas dependerá de la especie y de sus requerimientos, de la edad, talla, y tasa de crecimiento además de las condiciones medioambientales e interacción de los nutrientes (Sargent y col., 1995, 1999, 2002). Por ejemplo, los peces carnívoros y herbívoros difieren en su capacidad de utilizar los carbohidratos complejos o los piensos vegetales (Halver, 1976).

Entre las principales vitaminas, la C y E actúan como antioxidantes (ralentizando la degradación de los aceites de pescado), además, la vitamina C interviene en el mantenimiento de la integridad del colágeno del tejido conectivo. La vitamina A interviene en la visión, la vitamina D es la responsable de la integridad de los huesos y la vitamina K de la coagulación sanguínea y de la integridad de la piel (Jauncey, 2000).

Los minerales juegan un papel importante en procesos metabólicos como la osmoregulación, en el equilibrio ácido base y en la transmisión de impulsos nerviosos y contracción muscular. La gran diferencia con los animales terrestres es que los peces pueden utilizar los minerales disueltos en el agua a través de las branquias o incluso a través de toda la superficie corporal, sin embargo los minerales absorbidos del agua no satisfacen el requerimiento total, por lo que es necesario agregar minerales en la dieta. Entre los principales minerales encontramos al calcio, sodio, potasio, cloro, fósforo, magnesio, manganeso, hierro, zinc y cobre (Jauncey, 2000).

Las proteínas, constituidas por aminoácidos, son utilizadas como una fuente de energía e intervienen en el crecimiento de los peces. Existen ciertos aminoácidos que no pueden ser sintetizados por los peces y son los llamados "aminoácidos esenciales" que deberán ser administrados en la dieta, estos aminoácidos son: arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenil-alanina, treonina, triptofano y valina. Las cantidades requeridas de estos aminoácidos esenciales varían en gran medida entre los hábitos alimenticios de las especies, su exceso o deficiencia pueden tener efectos negativos en el crecimiento o la supervivencia de los peces (Moyle y Cech, 2000; Olivares-Teles, 2012).

En los ecosistemas naturales acuáticos, los carbohidratos y los lípidos constituyen una fuente de energía para los peces. Los lípidos pueden ser de origen animal o vegetal, mientras que los carbohidratos se encuentran casi exclusivamente en plantas. Dentro de los carbohidratos, los monosacáridos son los más digeribles, seguidos en orden por los disacáridos, polisacáridos simples, dextrinas, almidones cocidos y almidones crudos (Halver, 1976). Aunque como fuente de energía los carbohidratos resultan más económicos frente a los lípidos, la cantidad de energía que puede obtenerse de ellos es pequeña, por otro lado los estudios demuestran que la eficiencia de su aprovechamiento es mejor en especies herbívoras y omnívoras (como la carpa, el bagre o la tilapia) comparado con especies carnívoras (salmón, trucha, lubina, tiburones) (Akiyama 1988; Degani y col., 1997; Oliva-Tales, 2012).

Una forma poco frecuente de adquirir energía en algunos peces herbívoros y omnívoros como las anchovetas (*Engraulidae*), el bagre marino (*Arius felis*), la carpa común o europea (*Cyprinus carpio*) y el sábalo (*Dorosoma cepedianum*) es a través de las bacterias intestinales que rompen los tejidos vegetales, como la celulosa y otros azúcares. Los productos nutritivos obtenidos de la fermentación bacteriana de celulosa, fibra, almidón y azúcares son los ácidos grasos volátiles, que son rápidamente absorbidos y contribuyen sustancialmente a los requerimientos de energía de estos peces. Los lípidos constituyen la mayor fuente de energía de aprovechamiento inmediato para los peces con un valor específico de energía alto (8.0Kcal/g) (Halver, 1976). Además, proporcionan ácidos grasos esenciales que son utilizados en la formación de grasas o aceites (triglicéridos) que van a ser almacenados para utilizarlos posteriormente como fuente de energía. Un ejemplo de ello es el salmón del pacífico, el cual acumula grasa para los períodos en que migrará río arriba para reproducirse. Igualmente, los peces en inanición pueden utilizar la proteína y los lípidos del cuerpo como fuentes de energía (Moyle y Cech, 2000).

1.2.1. Las Fuentes de grasa en la alimentación.

El sector de la acuicultura depende en gran medida de la pesca de captura marina para el abastecimiento de insumos nutricionales en la fabricación de los piensos para cultivos acuícolas, especialmente de especies omnívoras, carnívoras y crustáceos. Uno de los componentes fundamentales del pienso es el aceite de pescado, principal fuente de ácidos grasos esenciales altamente poliinsaturados (HUFA) omega-3 que proveen energía a los peces y que no afectan a la composición lipídica ni a las características organoléptica de la canal de los peces (Sargent y col., 2002). Tacon y Metian (2008) estimaron que en el año 2006 el sector de la acuicultura utilizaba el 88,5% de la producción de aceite de pescado y se cree que a largo plazo el sector de la acuicultura usará cantidades cada vez mayores debido a su crecimiento, especialmente en Europa (Turchini, y col., 2009). Cabe señalar sin embargo, que en los últimos años se viene incluyendo nuevas fuentes de ácidos grasos de origen animal o vegetal (Hardy, 2008; Turchini y col., 2009; Oliva-Teles, 2012) debido al incremento del coste del aceite de pescado y con el fin de mejorar la utilización sostenible de los recursos marinos (FAO 2012).

Entre los aceites vegetales que pueden ser utilizados como fuentes de ácido graso y en especial del ácido linoleico tenemos el aceite de colza, maíz, girasol, soja y de palma. A diferencia del ácido linolénico que solo se puede encontrar en el aceite de linaza (Turchini y col., 2009). Del mismo modo, es importante mencionar que los aceites vegetales contienen también pequeñas cantidades de fitosteroles cuya propiedad más importante es la de reducción la absorción del colesterol en los intestinos (Ostlund y col., 2003) proporcionando de ésta manera beneficios en la salud.

1.2.2. Los ácidos grasos.

A través del tiempo se ha producido cambios en los hábitos alimenticios, fundamentalmente en el tipo de grasa consumida. Se ha producido un aumento en el consumo de grasa animal saturada frente al de grasas insaturadas procedentes de alimentos vegetales y productos marinos (Sheehy y Sharma, 2010; Austin y col., 2011).

Este cambio en la composición de la dieta determina en gran medida la composición de los ácidos grasos de los tejidos, el metabolismo y la salud del ser humano (Simopoulos, 1999; Devlin, 2004). En peces, al igual que en los mamíferos, los requerimientos para el buen desarrollo y funcionamiento corporal pasan por el aporte en la alimentación de los ácidos grasos que juegan un papel fundamental en el suministro de energía, función muy importante ya que la mayoría de los peces digieren mal los glúcidos complejos (Guillaume, 2004).

Los ácidos grasos están formados por una larga cadena hidrocarbonada lineal de diferente longitud o número de átomos de carbono y en cuyo extremo se sitúa un grupo carboxilo. La configuración más sencilla de un ácido graso es una cadena lineal completamente saturada, la fórmula básica es $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n\text{-COOH}$ (Ziegler y Filer, 1996; Devlin, 2004). Los ácidos grasos más comunes de los sistemas biológicos tienen un número par de átomos de carbono, aunque algunos organismos sintetizan ácidos grasos con un número impar de carbonos. La mayor parte de los ácidos grasos en plantas y animales superiores tienen 16, 18 ó 20 átomos de carbono, si bien hay varios con cadenas más largas y se encuentran principalmente en los lípidos del sistema nervioso como es el caso del ácido de nervónico y el ácido docosahexaenoico (Devlin, 2004).

El almacenamiento de los ácidos grasos para su utilización futura suele ser en forma de ésteres de glicerol, como los triacilgliceroles en los que tres grupos de hidroxilo del glicerol están esterificados con un ácido graso. Una de las propiedades más significativas de los ácidos grasos y de los triacilgliceroles es su falta de afinidad por el agua, esta naturaleza hidrófoba los hacen compuestos eficientes para ser la principal reserva energética en los animales y vegetales (Devlin, 2004; Melo y Cuamatzi, 2006).

Tanto la dieta como la biosíntesis suministran los ácidos grasos requeridos por el organismo para la obtención de energía y la construcción de estructuras biológicas complejas. Debido a que muchos mamíferos superiores, son incapaces de producir ácidos grasos con dobles enlaces muy cerca del extremo metilo de la molécula, es muy importante suministrar proporciones adecuadas de ácidos grasos con grados de

insaturación relativamente elevados como son el ácido linoleico y el ácido linolénico, esenciales en la dieta por ser los precursores de dos series de ácidos grasos poliinsaturados (Devlin, 2004).

1.2.2.1. Estructura Química.

Los ácidos grasos están constituidos por una cadena hidrocarbonada hidrofóbica de longitud variable que están unidos entre sí por un enlace covalente sencillo o doble denominado insaturaciones. Presentan en un extremo terminal un grupo carboxilo (-COOH) hidrofílico (carbono alfa- α -) y en el otro un grupo metilo (CH_3 -) (Figura 2). El grupo carboxilo es reactivo y forma fácilmente uniones de tipo éster con grupos alcohol de forma que la reacción con el colesterol o el glicerol da lugar a ésteres de colesterol y acilglicerol respectivamente (García, 2007).

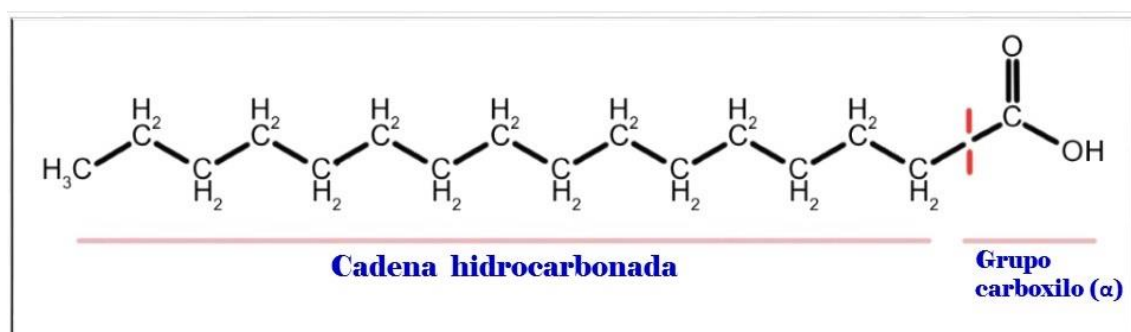


Figura 1.2. Estructura química de los ácidos grasos.

1.2.2.2. Nomenclatura

El nombre común de los ácidos grasos ha sido aceptado para su uso en la nomenclatura oficial. En la tabla 1.1 se presentan algunos ejemplos de los principales ácidos junto con el nombre sistemático. La abreviatura oficial consiste en el número de átomos de carbono seguido por dos puntos y el número de dobles enlaces. Los átomos de carbono se numeran a partir del carbono carboxílico (como número 1) y la localización de los dobles enlaces se designa por el número del átomo de carbono donde

éste empieza, contando a partir del extremo carboxilo del ácido. Así, el ácido oleico (AO) se designa como 18:1(9) ó 18:1n-9; donde el número 18 nos indica el número de carbonos, el 1 el número de dobles enlaces y el 9 que el doble enlace se sitúa entre el 9º y el 10º carbono contando desde el extremo –COOH. En algunos casos es también común nombrar a los ácidos grasos reemplazando la letra **n** por la letra griega omega (**ω**), así, un ácido graso ω-3 será el que tenga su primer doble enlace entre los carbonos 3 y 4, y un ácido graso ω-6 tendrá el primer doble enlace entre los carbonos 6 y 7, siempre a contar desde el extremo CH₃– (Figura 1.3). Otra forma alternativa de nombrar a los ácidos grasos es usar la nomenclatura delta (Δ), la cual describe la longitud de la cadena, el número y la posición del doble enlace desde el extremo final carboxilo, por ejemplo el ácido linoleico (LA) 18:2n-6 es 18:2Δ^{9,12} ó Δ^{9,12}-18:2, el ácido araquidónico (AA) 20:4n-6 es 20:4Δ^{5,8,11,14} ó Δ^{5,8,11,14}-20:4 y el ácido docosahexaenoico (DHA) 22:6n-3 es 22:6Δ^{4,7,10,13,16,19} ó Δ^{4,7,10,13,16,19}-22:6 (Bell y Koppe, 2011; Turchini, y col., 2011). Otra nomenclatura muy usada consiste en denominar a los ácidos grasos por su forma común: ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico, etc. (Calder y Field, 2002). En la figura 1.4 se muestra un ejemplo con las diferentes nomenclaturas de los principales ácidos grasos

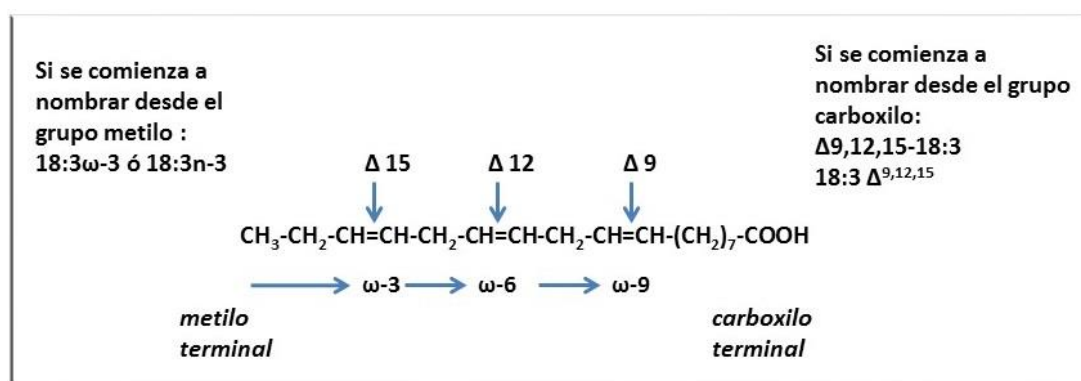


Figura 1.3. Estructura del ácido linolénico mostrando los sistemas de nomenclatura.

Tabla 1.1. Nomenclatura de los principales ácidos grasos. Modificada de Calder y Field, 2002

NOMBRE COMUN	NOMBRE IUPAC	ESTRUCTURA QUIMICA	ABREVIATURA	SERIE
Ácido Palmítico	Ácido Hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	C16:0	
Ácido Palmitoleico	Ácido 9-Hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	C16:1(9)	
Ácido Estearico	Ácido Octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	C18:0	
Ácido Oleico (OA)	Ácido 9-Octadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	C18:1(9)	ω -9
Ácido Linoleico (AL)	Ácido 9,12-octadecadienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:2(9,12)	ω -6
Ácido Linolénico(ALN)	Ácido 9,12,15-octadecatrienoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	C18:3(9,12,15)	ω -3
Ácido Gamma Linolénico (GLA)	Ácido <i>cis</i> -6,9,12-octadecatrienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	C18:3(6,9,12)	ω -6
Ácido Araquídico	Ácido eicosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	C20:0	
Ácido Araquidónico (AA)	Ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	C20:4(5,8,11,14)	ω -6
Ácido Eicosapentanoico (EPA)	Ácido 5,8,11,14,17-icosapentaenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	C20:5(5,8,11,14,17)	ω -3
Ácido Docosapentanoico (DPA)	Ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	C22:5(7,10,13,16,19)	ω -6
Ácido Docosahexaenoico (DHA)	Ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	C22:6(4,7,10,13,16,19)	ω -3

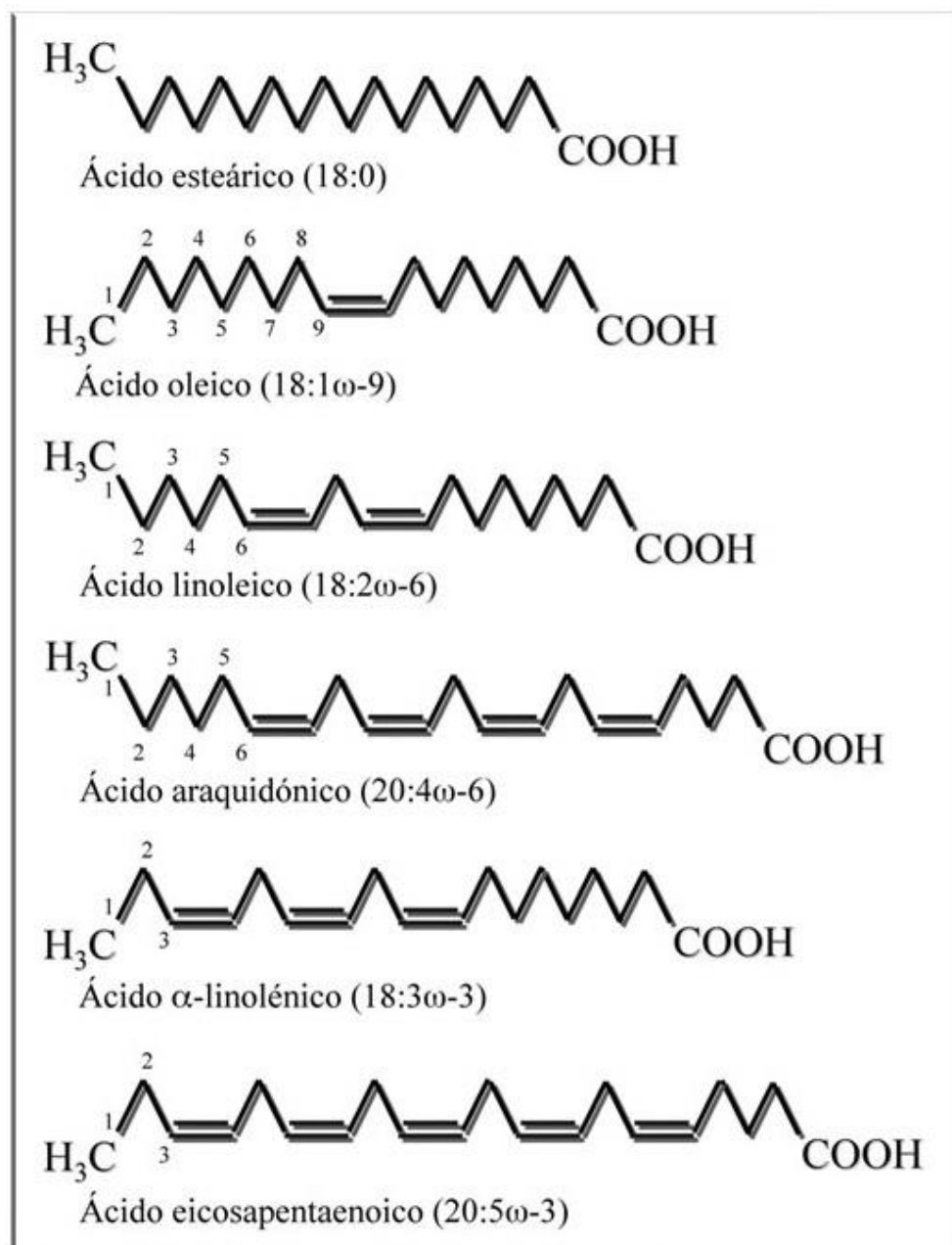


Figura 1.4. Estructura química y nomenclatura de los principales ácidos grasos.

1.2.2.3. Clasificación

La estructura de la cadena hidrocarbonada, es la que determina las características químicas y biológicas de los distintos ácidos grasos. Estas diferencias estructurales se basan fundamentalmente, en el número de átomos de carbono, en la presencia, ausencia y posición de dobles enlaces o insaturaciones, en su configuración espacial y por su importancia nutricional.

Por la Presencia y Número de Dobles enlaces en la Cadena Hidrocarbonada.

Ácidos grasos saturados (SFA), presentan características poco recomendables en la dieta ya que su ingesta se encuentra relacionada con una mayor probabilidad de sufrir enfermedades cardiovasculares debido a su incidencia sobre el colesterol LDL denominado coloquialmente como “colesterol malo”. Se encuentran en la grasas de origen animal y en algunos vegetales como el coco y el aguacate. Contiene el máximo número de átomos de hidrógeno por lo que todos los enlaces entre sus átomos de carbono son simples, sin ningún doble enlace.

Ácidos grasos moninsaturados (MUFA) presentan una sola insaturación en su estructura, es decir poseen un solo doble enlace de carbono. El más abundante en aceites vegetales y grasas animales es el ácido oleico. Se encuentran en el aceite de oliva (70%), aceite de sésamo (40%), aceite de cacahuete (40%), aceite de salvado de arroz (45%), grasa de bovino (40%) y manteca de cerdo (45%) entre otros.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), poseen más de un doble enlace entre sus carbonos y si la cadena contiene más de cuatro dobles enlaces se les denomina ácidos grasos altamente poliinsaturados (**HUFA**). Están presentes en aceites de semillas, frutos secos y pescados azules. Al no sintetizarse en el organismo, son considerados “esenciales” y deben obtenerse de la dieta. Entre otros muchos beneficios se les atribuye a su consumo la disminución del colesterol total.

Por la posición del doble enlace relativo al último carbono de la cadena hidrocarbonada.

Omega 3 (ω -3), son de tipo poliinsaturado y se caracterizan porque el doble enlace se encuentra a tres carbonos del extremo metilo (CH_3). Son los llamados “esenciales” y se encuentran en altas cantidades en los pescados azules y en algunas fuentes vegetales como la salvia (*Salvia sclarea*) las semillas de lino y calabaza.

Omega 6 (ω -6), son de tipo poliinsaturado y se caracterizan porque el doble enlace se encuentra a seis carbonos del extremo metilo (CH_3). Entre los más importantes mencionaremos al ácido linoleico (AL), ácido gamma-linolénico (GLA) y el ácido Araquidónico (AA). Podemos encontrarlos en la mayoría de aceites vegetales, soja, nueces, aguacate, huevos y grasas animales.

Omega 9 (ω -9), son de tipo monoinsaturado y se caracterizan porque el doble enlace se encuentra a nueve carbonos del extremo metilo (CH_3). Dos ácidos grasos importantes ω 9 son el ácido oleico y el ácido erúcico, que puede ser encontrados en la canola (*Brassica napus*) y la mostaza (*Brassica*).

Por su configuración espacial.

Cis, describe la orientación de los átomos de hidrógeno con respecto al doble enlace. En forma natural, los ácidos grasos tienen la configuración Cis, es decir los átomos de hidrogeno están en el mismo lado del doble enlace. La mayoría de ácidos grasos insaturados suelen presentar esta configuración.

Trans, describe la orientación de los átomos de hidrógeno con respecto al doble enlace. En la configuración Trans los átomos de hidrógeno se disponen uno a cada lado del doble enlace.

Por su importancia nutricional.

Ácidos Grasos Esenciales: No son sintetizados por los vertebrados y deben ser aportados por la dieta, únicamente los vegetales pueden sintetizarlos. Son necesarios para el metabolismo celular (actúan como precursores de otras sustancias, como las prostanglandinas o los leucotrienos) así como para el mantenimiento de la integridad de la estructura de membrana (Sargent y col., 1999a; Tocher, 2003), además intervienen en la estructura de los distintos orgánulos celulares y modulando la actividad de la mayoría de las enzimas y receptores celulares, la transmisión de impulsos nerviosos, la actividad de los trombocitos, el comportamiento de los leucocitos, etc. En este grupo encontramos al ácido linoleico (AL) y el ácido linolénico (ALN), importantes por ser precursores de otros ácidos grasos fundamentales para el ser humano, como el ácido araquidónico (AA), Eicosapentanoico (EPH) y Docosahexaenoico (DHA) que se forman debido a procesos de elongación y de desaturación particularmente en el hígado. Las principales fuentes de ácidos grasos esenciales para el AL son los aceites vegetales (aceite de linaza, aceite de soja y las nueces), mientras que el pescado azul (arenque, salmón, caballa) es la principal fuente de ácidos grasos altamente poliinsaturados como el EPA y el DHA (Romero y col., 1996; Patterson y col., 2012). Se sabe que las proporciones de PUFA que contienen los peces depende del tipo de alimentación, por ejemplo en peces carnívoros la cantidad de DHA es de 2 a 3 veces mayor que el EPA (Sikorski y Kolakowska, 2002).

Ácidos Grasos No esenciales: Son sintetizados por el organismo a partir de una grasa saturada, por lo que no es necesario ingerirlos con la dieta. En este grupo encontramos a los ácidos grasos ω -9 como el ácido Oleico presente por ejemplo en el aceite de oliva.

1.2.2.4. Biosíntesis de los Ácidos Grasos.

Los procesos de biosíntesis de ácidos grasos presentan numerosas similitudes entre los peces y los mamíferos. En la mayor parte de los casos se sintetiza en primer lugar el ácido palmítico, ácido saturado de cadena lineal de 16 carbonos, y los demás ácidos grasos se obtendrán mediante modificaciones del ácido palmítico en diferentes proporciones según la especie (Sargent y col., 2002; Guillaume y col., 2004; Bell y Koppe, 2011).

La síntesis de ácidos grasos ocurre en el citoplasma de la célula de los adipocitos o mayoritariamente en el hígado a partir de precursores no lipídicos (principalmente carbohidratos), por medio del complejo Ácido graso Sintetasa, utilizando como precursor el Acetil-CoA que está unido al complejo enzimático Malonil-CoA y la acción de la enzima Fatty Acid Synthase (FAS). La síntesis del malonil-CoA es el primer paso para la síntesis de ácidos grasos y la enzima que cataliza, limita esta reacción es la *Acetyl-CoA Carboxylase* (ACC) que está regulada mediante distintos metabolitos y hormonas. El Acetil.CoA y el Malonil-CoA son transferidos a la porción transportadora del complejo de síntesis (ACP) por acción de la transacilasa acetil.CoA y la transacilasa malonil-CoA, respectivamente. La unión de estos átomos de carbono a la ACP permite que estos entren al ciclo de la síntesis de ácidos grasos (García, 2007).

El complejo multienzimático detiene su proceso cuando el ácido graso formado es de 16 átomos de carbono [ácido palmítico (16:0)]. La participación del ácido palmítico en diversas rutas metabólicas de elongación y desaturación permite la síntesis de ácidos grasos como el esteárico (18:0) y oleico (18:1n-9). Considerando también que tanto mamíferos como peces marinos carnívoros han perdido la capacidad de desaturar y elongar más allá del carbono 9. La síntesis de AL o ALN, precursores de los ácidos grasos PUFA, deberán ser adquiridos en la dieta ya que esta síntesis se lleva a cabo solo en plantas superiores, algas y el fitoplancton (Watanabe, 1982; García, 2007; De Silva, y col., 2011).

El proceso de desaturación, por el cual se producen los ácidos grasos monoinsaturados palmitoleico y oleico implica introducir insaturaciones en las posiciones C5, C6 ó C9 y para esto, es necesario la especificidad de las enzimas acil-CoA desaturasas como la delta 5 eicosatrienoyl-CoA desaturasa, delta 6 oleoil(linolenoyl)-CoA desaturasa y delta 9 estearoil-CoA desaturasa (SCD). Estos dos ácidos grasos monoinsaturados representan la mayoría de los monoinsaturados presentes en los fosfolípidos de membrana, los triglicéridos y el colesterol.

Los ácidos grasos de cadena corta de 18 átomos de carbono AL y ALN obtenidos en la dieta, precisan de la enzima delta-6-desaturasa (FAD6) para desarrollar sus derivados de cadena más larga. Aunque la afinidad de la FAD6 por los ácidos grasos ω -3 (ALN) es mayor que para los ω -6 (AL), una elevada ingesta de AL interfiere en la desaturación y elongación de los ALN (Brenna y col., 2009; Bell y Koppe, 2011).

La síntesis de los ácidos grasos PUFA ω -6 se lograrán a partir del precursor AL, por acción de dos enzimas desaturasas (delta-5-desaturasa: FAD5 y FAD6) y una elongasa que darán lugar al AA (20:4n-6). De la misma manera se obtendrán los ácidos grasos poliinsaturados ω -3 a partir del ALA, que dará lugar al Ácido Eicosapentaenoico (20:5n-3) que tras dos elongaciones, una desaturación y un acortamiento de la cadena de carbono, dará lugar al Ácido Docosahexaenoico (22:6n-3) (Tocher y col., 2002, 2003; Zheng y col., 2005; Tocher y col., 2006) (Figura 1.5).

En peces, se considera que los de agua dulce son más efectivos a la hora de elongar y desaturar los ácidos grasos PUFA (AL y ALN) a C20 o C22 que los peces marinos. No está del todo claro, pero se cree que los peces marinos pierden o tienen inhibida ésta habilidad ya que cubren los requerimientos de ácidos grasos a través de su dieta (Mourete y col., 2005; Tocher y col., 2006). Sargent (1995), estudió el metabolismo de ácidos grasos en diversas especies de peces marinos y encontró evidencias que mostraban que la conversión de ALN a EPA y DHA y de AL a AA y DHA no ocurría, debido a que el alimento natural del medio marino presenta abundante cantidad de EPA y DHA y menor cantidad (pero importante) de AA (Mourete y col., 1991). Así pues, en los peces marinos, tendría que considerarse que ácidos grasos esenciales el AA, EPA y DHA (Sargent y col., 1995).

Se sabe también, que en el caso de mamíferos terrestres las series linoleicas ω -6 muestran mayor actividad de ácidos grasos esenciales frente a las series linolénicas ω -3 que tienen una actividad parcial. Debido a este mecanismo, los ácidos grasos poliinsaturados que predominan en los tejidos de los animales terrestres pertenecen a las series linoleica ω -6 como el ácido linoleico y el ácido araquidónico. Por el contrario, los AGPI más abundantes en los tejidos de peces y crustáceos, tanto para especies dulceacuícolas como marinas, pertenecen a las series linolénicas ω -3.

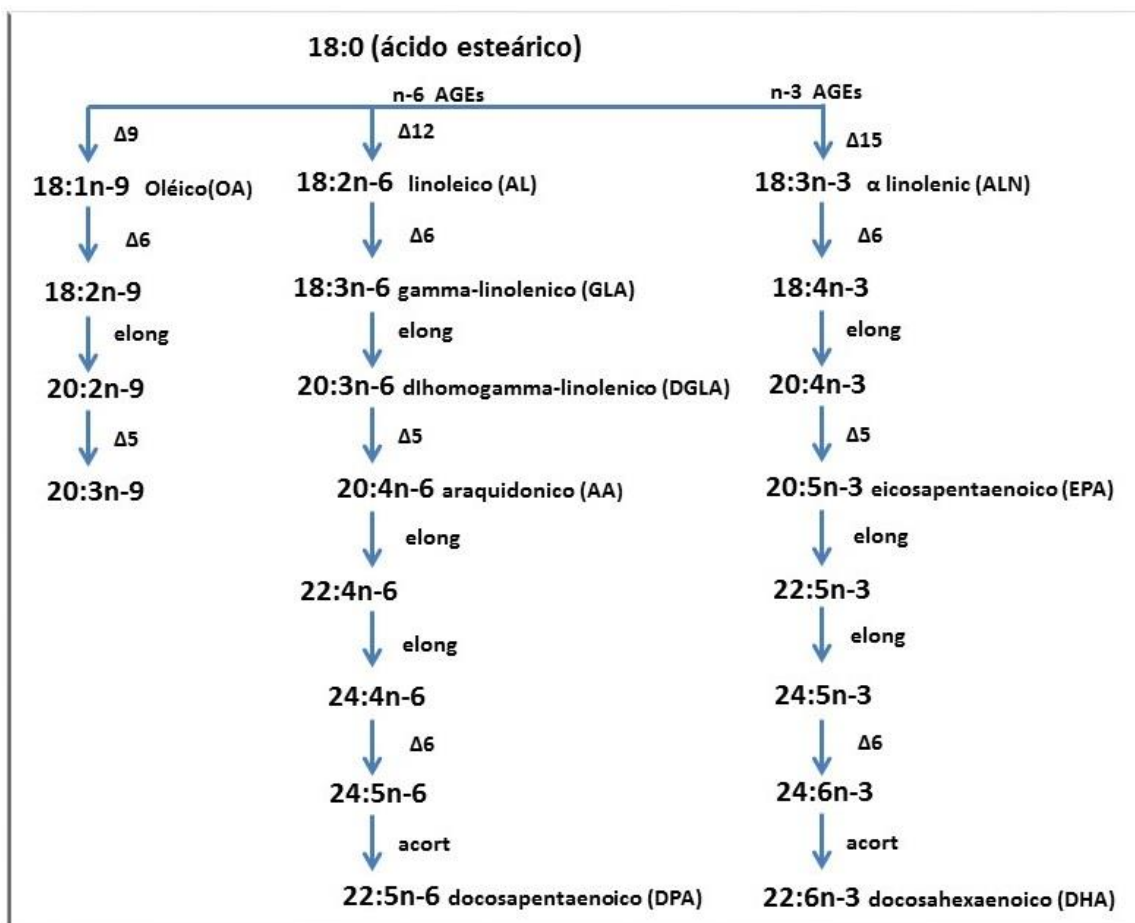


Figura 1.5. Ruta de la elongación y desaturación de los ácidos grasos.

1.2.2.5. Oxidación de los Ácidos Grasos.

El papel de los ácidos grasos en todos los organismos es proporcionar energía en forma de ATP a través de la oxidación. La β -oxidación de los ácidos grasos es el principal proceso productor de energía, pero no el único. Algunos ácidos grasos, como los de cadena impar o los insaturados requieren, para su oxidación, modificaciones de la β -oxidación o rutas metabólicas distintas. Tal es el caso de la α -oxidación, la ω -oxidación o la oxidación peroxisómica (Devlin, 2004)

La β -Oxidación consiste en la liberación consecutiva de unidades de dos carbonos en forma de acetil-CoA de la molécula de ácido graso y se produce mayoritariamente en la matriz mitocondrial (con la participación de las enzimas carnitín-palmitoil-transferasa I y II, y la carnitin/acilcarnitin translocasa) (Jansen y Wanders, 2006). Una fracción significativa de la oxidación de los ácidos grasos se produce también en los peroxisomas, los cuales tienen especificidad para ácidos grasos de cadena más larga (PUFA y HUFA) y a menudo no degradan totalmente la molécula, por lo que una posible función de este proceso puede ser el acortamiento de ácidos grasos de cadena larga hasta un punto en que la mitocondria pueda completar su β -oxidación (Wanders y col., 2001; Sargent y col., 2002; Devlin, 2004; Jansen y Wanders, 2006).

El proceso de la β -oxidación se inicia cuando se rompe el enlace entre los carbonos alfa y beta (segundo y tercero) de la cadena desde el extremo carboxilo (-COOH) de la molécula y se repite hasta la degradación completa de la cadena. Cada vez que se libera un acetil-CoA del ácido graso activado, la cadena se acorta en dos carbonos, este proceso se lleva a cabo por medio de una secuencia de cuatro reacciones consecutivas. Primera oxidación, hidratación, segunda oxidación y tiólisis. Al conjunto de reacciones se le conoce también como “una vuelta de β -oxidación” y cumple la finalidad de oxidar el carbono β y liberar una molécula de acetil-CoA que se dirigirá al ciclo de Krebs. Como ejemplo tenemos que para oxidar completamente el palmitoil-CoA se necesitan siete vueltas de β -oxidación. Finalmente en cada ciclo de la β -oxidación, se genera 1 NADH, 1 FADH₂ y 1 Acetil-CoA (Figura 1.6).

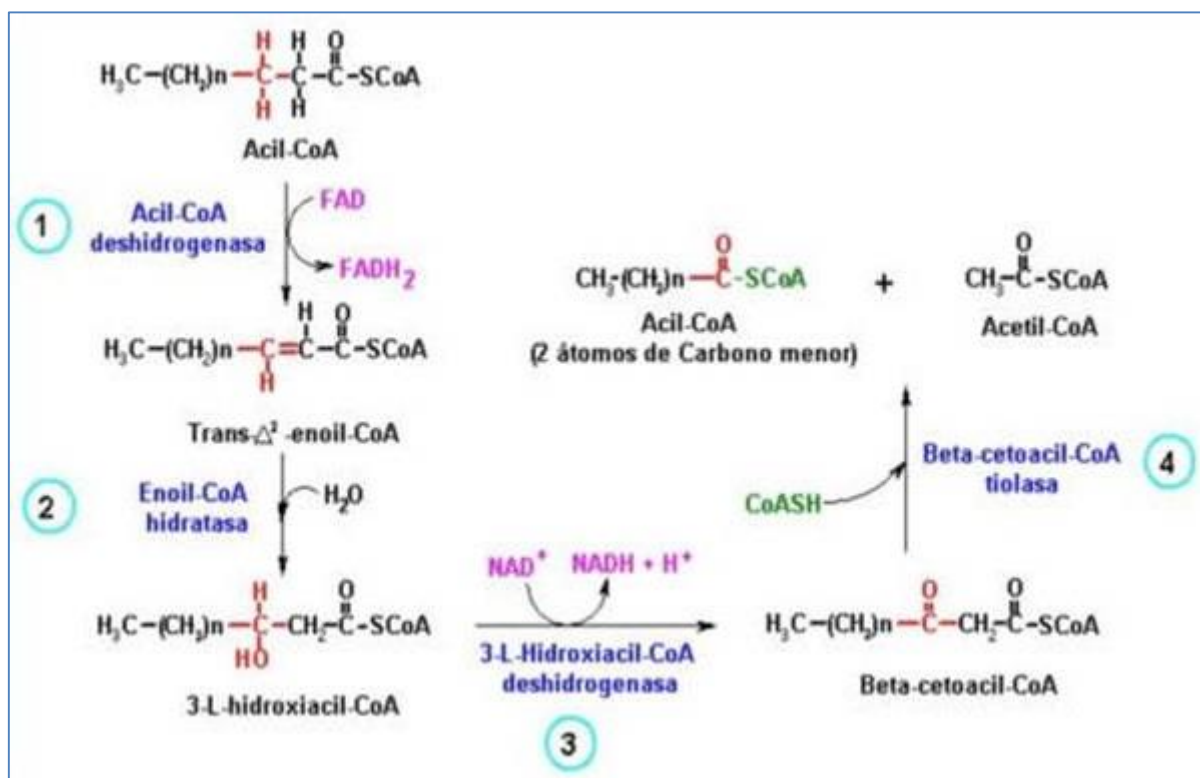


Figura 1. 6. Secuencia enzimática de la β -oxidación.

La oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas, a diferencia de la mitocondrial, degrada la cadena hidrocarbonada hasta que quedan 8 carbonos (octanil-CoA) y el potencial electrónico se transfiere al O₂ para generar H₂O₂. La enzima catalasa, exclusiva de los peroxisomas, metaboliza el H₂O₂ para producir H₂O y O₂ (Wanders, 2004). En contraste con la mitocondria, que transforma el FADH₂ producido por la acil-CoA deshidrogenasa en ATP, en los peroxisomas la energía producida se disipa en forma de calor. Sólo el 10% de los AGs que se oxidan lo hacen en los peroxisomas; sin embargo, estos niveles pueden ser incrementados significativamente si se induce la proliferación de peroxisomas con medicamentos o por una dieta rica en grasas.

El proceso final de la oxidación de los ácidos grasos se produce con el paso de los acetil-CoA, obtenidos por la oxidación tanto en peroxisomas como en mitocondrias, hacia el citosol de la célula y desde ahí hacia el ciclo de Krebs que es un complejo proceso de reacciones químicas que tienen como finalidad la obtención de energía (Berg, 2002).

En peces, el músculo rojo, hígado y el corazón son conocidos como los tejidos donde se produce la mayor capacidad de producción de energía a través de la β -oxidación (Henderson y Tocher, 1987), sin embargo en peces donde la cantidad de músculo blanco es mayor, el total de la actividad de la β -oxidación será también alta por lo que puede ser considerado como un tejido productor de energía (Froyland y col., 2000). Otros factores como tamaño del pez, maduración y variación climática afectan también la β -oxidación (Wanders y col., 2001).

1.2.3. Importancia de los Ácidos Grasos Poliinsaturados (ω -3 y ω -6)

Todas las especies de vertebrados necesitan incluir en su dieta ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las series ω -3 y ω -6, conocidos también como "ácidos grasos esenciales". Se ha demostrado la relación existente entre su consumo y la actividad protectora que ejercen sobre enfermedades cardiovasculares (Yamagishi y col., 2008; Russo, 2009; Jump y col., 2012), problemas inflamatorios y autoinmunes (Wall y col., 2010; Patterson, y col., 2012), hipertensión arterial (Cabo y col., 2012; Noori y col., 2011), cáncer (Arem y col., 2013), diabetes (Wu y col., 2012), hígado graso no alcohólico, obesidad, y artritis reumatoide (Sargent y col., 2002; Singh y col., 2012). Los estudios han demostrado que es importante mantener un balance equilibrado de ω -6/ ω -3 en la dieta, debido a que comparten a las enzimas implicadas en el metabolismo del AL y ALN y por tanto competirán entre ellos por su regulación. En las sociedades actuales, donde el balance de ácidos grasos ω -6/ ω -3 se ha visto alterado por el consumo de dietas basadas en mayor cantidad de calorías, ácidos grasos saturados, ácidos grasos trans y ácidos ω -6 frente a una disminución del consumo de carbohidratos, fibra, frutas, hortalizas y ácidos ω -3, el efecto sobre la salud se verá afectado a través del desarrollo o la predisposición a diversas enfermedades (Simopoulos, 2008).

La importancia en la salud de los ácidos grasos omega-3 EPA y DHA fueron descritos por primera vez en grupos de esquimales de Groenlandia, quienes consumían dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados ω -3 (EPA y DHA) procedentes de animales marinos como el pescado, las ballenas y las focas. Los resultados demostraron que las grasas y los ácidos grasos de animales marinos podían prevenir el desarrollo de

arteriosclerosis y por lo tanto explicar la baja tasa de mortalidad cardiovascular en este grupo de población. En contraposición, los esquimales que emigraban a Dinamarca o los propios daneses, cuyo consumo de grasa y proteína animal era elevada, presentaron mayor incidencia de infartos y coronariopatías (Bang y Dyerberg, 1972; Simopoulos, 2002).

Posteriores estudios dieron a conocer que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) ω -6 y ω -3 son precursores de los eicosanoides (prostanglandinas, tromboxanos, prostaciclina y leukotrienos) que participan como mediadores de diversas funciones biológicas en respuesta a los estímulos (Sargent y col., 2002, Wall y col., 2010). Se sabe, respecto al DHA, que contribuye en la función sináptica y su bajo contenido en las membranas de las neuronas propicia descenso de la transmisión de impulsos nerviosos (Jackson y col., 2012). Otros estudios demuestran también que aspectos relacionados con la estructura y función cerebral están relacionados con una adecuada concentración de AA y DHA. Enfermedades como el Alzheimer y el trastorno bipolar podrían estar condicionados por alteraciones en el metabolismo de los PUFA (Rapoport, 2008).

Respecto al efecto beneficioso del ácido ω -3 en enfermedades de la piel, usando modelos animales, se ha demostrado que la administración de aceite de pescado con alto contenido en ácidos grasos ω -3 consigue suprimir la expresión de citoquinas y disminuir significativamente la dermatitis (Park y col., 2012). De la misma manera, existen evidencias que los ácidos grasos ω -6 y ω -3, AA y EPA tienen un papel importante en la regulación de procesos inflamatorios (Tocher y col., 1996; Wall y col., 2010; Patterson y col., 2012 como la osteoartritis y que especialmente el EPA presenta un efecto anti-inflamatorio inhibiendo el proceso de degradación del cartílago y estimulando los procesos formación del mismo (Bell y Sargent 2003; Wall y col., 2010; Dzielska-Olczak y Nowak, 2012).

En peces (sobre todo en especies carnívoras) la importancia de los "ácidos grasos esenciales" es la misma que en otros vertebrados. Las funciones principales son generar energía en forma de ATP por la vía de la β -Oxidación (Sargent y col., 2002), mantener la estructura y la fluidez de las membranas (Sargent y col., 1999a; Tocher, 2003) y ser precursores de eicosanoides (Trautwein, 2001). Los ácidos grasos AA y EPA

participan también en la función reproductiva, en los procesos de osmoregulación, liberación de hormonas o el control de la respuesta al stress (Stanley-Samuelson, 1994; Koven y col., 2001).

Tradicionalmente, se ha explicado la mayor concentración de DHA que se encuentra en los tejidos de los peces como una adaptación a las bajas temperaturas, lo que permitiría un grado mayor de insaturación y esto a su vez una mayor fluidez de membranas, flexibilidad y permeabilidad (Sargent y col., 2002). Por otro lado el EPA y el DHA (principalmente), son constituyentes estructurales importantes en las membranas de los peces y desempeñan un papel importante en el desarrollo de la larva, así el DHA es particularmente importante en el desarrollo del tejido nervioso y de la retina siendo el principal ácido graso presente en los fotorreceptores (conos y bastones) (Rainuzzo y col., 1997; Sargent y col., 1999b). Bell y col., 1995b demostró que la habilidad de las larvas de arenque (*Clupea harengus*) para distinguir y capturar presas vivas, especialmente en condiciones de baja iluminación, se veía afectada por la deficiencia de DHA en su alimentación. En el caso de *Polydactylus sexfilis*, la deficiencia de DHA en la dieta se tradujo en cambios en el comportamiento habitual de la especie (Masuda y col., 2001).

Dos signos de deficiencia de los AGE en los peces son un pobre crecimiento y una baja eficiencia alimenticia (Sargent y col., 2002). Jauncey, (2000), reporta que en tilapias, las deficiencias en los ácidos grasos esenciales pueden producir disminución del crecimiento, inapetencia, problemas de salud (erosión de las aletas), hígado graso y/o respuestas erráticas y pronunciadas a cualquier cambio en el ambiente o por manejo. Los requerimientos de AGE en peces varían con la etapa de desarrollo y con la fuente de lípido (Watanabe, 1982; Izquierdo 2005), las cantidades necesarias de AGE en las especies deberán ser establecidas en función del equilibrio óptimo entre los ácidos grasos ω -3 y ω -6 (Sargent y col., 2002) ya que cantidades por encima de los requerimientos óptimos durante mucho tiempo causarán la disminución del crecimiento (Yu y Sinnhuber 1976).

1.2.4. Requerimientos de Ácidos Grasos en Peces de Agua Dulce y Marina.

Una de las principales diferencias nutricionales entre especies de peces de agua dulce y especies marinas es la alimentación y consecuentemente los requerimientos de ácidos grasos ω -3 y ω -6 poliinsaturados (Sargent y col., 2002) debido a su habilidad (o la pérdida de ella) de elongar el AL y ALN para la síntesis de los PUFA (AA, DHA y EPA) (Hastings, 2001; Tocher y col., 2002; Bell y Sargent, 2003).

Muchas especies de agua dulce como la tilapia (*Oreochromis niloticus*), carpa (*Cyprinus carpio*), zebrafish (*Danio rerio*), salmón (*Salmo salar*) y trucha (*Oncorhynchus mykiss*) son capaces de convertir los ácidos grasos de 18 carbonos en ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados como AA, EPA y DHA gracias a la actividad de la enzima FAD5, por lo que solo necesitan un requerimiento diario de los precursores del C18 en su dieta (Castell y col., 1972; Olsen y col., 1990; Bell y Sargent, 1992; Xu y col., 1996; Mourente y Tocher, 1998; Tocher y Dick, 1999; Tocher y Dick, 2000; Tocher y col., 2000; Hastings, y col., 2001; Tocher y col., 2002). Por el contrario, especies marinas como la dorada (*Sparus aurata*) tienen una baja expresión de las enzimas elongasa y FAD5 requeridas para la conversión de AL hacia el AA y del ALN hacia el EPA (Mourente y Tocher 1993); además la actividad de la elongasa en el paso del EPA hacia el DHA necesario durante el desarrollo larval disminuye (Ghioni y col., 1999). Por tanto, las especies marinas dependen de la fuente de alimentación para obtener las cantidades requeridas de AA, EPA y DHA (Linares y Henderson, 1991; Mourente y Tocher, 1994; Bell y col., 1995a; Sargent y col., 1997, 1999a; Tocher y Ghioni, 1999).

Respecto a la dependencia de ácidos grasos poliinsaturados como el EPA, DHA y el ARA, algunos trabajos sugieren que puede deberse más como consecuencia de la presión evolutiva de las dietas naturales que del tipo de agua dulce o marina del que proceden los peces. La baja actividad de las enzimas elongasa y FAD5 en las especies marinas aparentemente son consecuencia de la alta prevalencia de estos PUFA en su dieta natural (Sargent, 1995; Bell, 1998). Estos estudios se apoyan por la observación del pez lucio europeo (*Esox lucius*), un carnívoro de agua dulce, que es capaz de desaturar y elongar el C18 hasta llegar al DHA (Henderson y col., 1995). Sin embargo, esta regla no

es siempre cierta, ya que comparando especies vegetarianas y carnívoras de pirañas (*Mylossoma aureum* y *Pygocentrus nattereri*) revelan que ambas especies son capaces de desaturar y elongar el AL y ALN (Henderson, 1996).

1.2.5. Fuentes Alternativas al Aceite de Pescado en Piensos para Acuicultura.

Los estudios sobre la disponibilidad y el uso de ingredientes de piensos acuícolas se centra a menudo en los recursos de harina y aceite de pescado (incluido el pescado de bajo valor), sin embargo, considerando el alto coste de la proteína y la necesidad de aumentar la producción mundial de pesca para cubrir la demanda de una población en aumento, resulta más probable que la sostenibilidad del sector acuícola dependa estrechamente del suministro constante de fuentes de carbohidratos, lípidos y proteínas de animales y plantas como por ejemplo la soja, el maíz, linaza, palma y subproductos de origen animal (Webster y col., 1991, Wu y col., 1995; Ali y Al-Asgah, 2001; Turchini y col., 2009; FAO 2012). El reemplazar o reducir los niveles de aceite de pescado en el pienso acuícola y mantener a su vez la salud de la especie cultivada y la salud humana como futuro consumidor, por su riqueza en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) ω -3 de cadena larga (EPA y DHA), es una de las principales razones que han estimulado las investigaciones en la búsqueda de nuevas fuentes de ácidos grasos en la alimentación de peces cultivados.

Los candidatos ideales para sustituir parcialmente el aceite de pescado en la formulación de dietas para peces parecen ser los aceites vegetales, pues los lípidos contenidos en las semillas de muchas plantas contienen una apreciable cantidad de ácidos grasos insaturados. El aceite de soja (*Glycine soja*), aceite de girasol (*Helianthus annuus*), aceite de cártamo (*Carthamus tinctorius*), aceite de onagra (*Oenothera biennis*), aceite de semilla de uva (*Vitis vinífera*), aceite de semilla de amapola (*Populus nigra*), aceite de semilla de borraja (*Borago officinalis*) y aceite de semilla de grosella (*Ribes nigrum*) contienen altas concentraciones de PUFA ω -6 (>60%). Mientras que en el aceite de germen de trigo (*Triticum vulgare*), aceite de maíz (*Zea mays*), aceite de nuez (*Juglans regia*), aceite de semilla de algodón (*Gossypium sp.*) y aceite de sésamo (*Sesamum indicum*) (USDA, 2010) las concentraciones varían entre un 40-50%. Respecto

a los ácidos grasos PUFA n-3, el aceite de la semilla de lino (*Linum usitatissimum*) contiene hasta un 58% de PUFA y es la semilla que se presenta como el mejor candidato para sustituir parcialmente el aceite de pescado como fuente lipídica, ya que, entre todos los aceites vegetales, parece ser el que menos afecta al sistema inmune. Algunos autores (Bell y col., 2001, Caballero y col., 2002) lo consideran como una buena fuente lipídica alternativa al pescado en dietas para salmónidos y peces de agua dulce. Otros ácidos grasos como el ácido oleico se encuentra en el aceite de oliva (*Olea europea*) con un contenido de 72,3%, pero también en el aceite de colza o canola (*Brassica napus*), aceite de cacahuete (*Arachis hypogaea*), aceite de avellana (*Corylus americana*), aceite de almendras dulces (*Prunus amygdalus dulcis*) y aceite de aguacate (*Persea gratissima*) (USDA, 2010). Otros aceites como el de coco (*Cocos Nucifera*) y de palma (*Elaeis guineensis*) contienen un 92 y 81,5% respectivamente de ácidos grasos saturados de cadena inferior a 15 átomos de carbono (Wood, 1992).

Estudios en salmónidos han demostrado que es posible reemplazar aceite de pescado por aceites vegetales de soja, maíz, lino, colza o palma sin afectar negativamente al crecimiento de los peces y a la eficacia nutritiva del pienso (Bell y col., 2002). Por el contrario, dicha sustitución si tiene efectos en la composición lipídica de los peces ya que en éstos, al contrario de lo que ocurre con la proteína, la composición lipídica no está determinada genéticamente y depende en gran medida de la composición en ácidos grasos de la dieta. Así, en diferentes investigaciones realizadas en salmón, trucha, y otras especies piscícolas, la sustitución de aceite de pescado por aceites vegetales produjo incrementos de las proporciones de ácidos grasos C18 mono y poliinsaturados, en detrimento de los PUFA de C20 y C22 (Bell y col., 2002, Turchini y col., 2003). Tocher y col., (2002) y Karapanagiotidis y col., (2007) observaron un aumento en las concentraciones de AO, AL y ALN y descenso del EPA, y DHA, cuando comparaban una dieta cuya grasa estaba formada por una mezcla de aceites vegetales con otra de aceite de pescado, en tilapia. Visentainer y col., (2005) observaron incrementos en la concentración de ALN, EPA y DHA al sustituir el aceite de girasol por aceite de lino en la dieta. Otros estudios, demostraron también que la sustitución del aceite de pescado por mezclas de aceites vegetales no afectan la salud de los peces (Mourete, y col., 2000;

Montero y col., 2003) a diferencia de reemplazarlo total o parcialmente con solo un aceite vegetal, donde se vio afectada la salud del pez en aspectos de inmunosupresión o resistencia al stress (Montero y col., 2003; Mourente y col., 2005).

En conclusión, los estudios sugieren que la sustitución en la dieta del aceite de pescado por mezclas de aceites vegetales, son aconsejables para obtener una correcta proporción de ácidos grasos ω -3/ ω -6 de tal manera que no afecte la salud de los peces.

1.3. Nutrigenómica y Nutrigenética.

El desarrollo de las técnicas de la biología molecular y la consecución del proyecto Genoma Humano iniciaron una nueva era tanto en medicina como en nutrición. En los últimos años, el análisis de tipos únicos de biomoléculas ha resultado extremadamente útil para la comprensión de los fenómenos biológicos, al mismo tiempo, la investigación paralela y a gran escala del ADN, ARN y proteínas ha abierto nuevas perspectivas para la interpretación y el modelado de la complejidad de los organismos vivos. Las nuevas disciplinas científicas con el sufijo "-ómica-" como la genómica estructural, la transcriptómica y proteómica a las que le siguen la metabolómica y la interactómica y los avances recientes en la preparación, identificación, secuenciado del ADN, ARN y proteínas, así como el procesado, análisis e integración de grandes volúmenes de datos gracias a la bioinformática, están creando una revolución en nuestros conceptos sobre genética molecular y nutrición (Palou y col., 2004; Trujillo y col., 2006).

Los resultados que se obtienen en torno a las nuevas tecnologías "ómicas" pretenden, entre otros objetivos, conocer los eventos moleculares implicados en las interacciones gen-nutriente y los mecanismos que expliquen las bases genéticas de las diferentes respuestas a los nutrientes (Trujillo, y col., 2006). Así pues, la industria alimentaria tendrá la oportunidad de utilizar los componentes bioactivos de los alimentos para mejorar la salud y evitar enfermedades teniendo en cuenta la constitución genética de los consumidores además de un mejor conocimiento de la influencia de los polimorfismos genéticos en el metabolismo de los nutrientes (Fenech y col., 2011).

En esta nueva era de la nutrición molecular (interacciones genes-nutrientes) surgen dos nuevos campos, la **Nutrigenómica** o Genómica Nutricional, que intenta integrar la genómica y la nutrición explicando el efecto o influencia que tienen los nutrientes en la regulación y la expresión de los genes y la **Nutrigenética**, que pretende conocer el efecto de las variaciones genéticas individuales en la respuesta del organismo a los nutrientes (Gillies, 2003; Ordovás and Corella, 2004; Simopoulos, 2010, Ulloa y col.,

2011). La Nutrigenómica y la Nutrigenética, pretenden explicar el mecanismo de la interacción gen-nutriente basándose en las siguientes consideraciones: Primero, las variantes genéticas afectan la absorción y el metabolismo de nutrientes y/o la interacción molecular entre las enzimas y su cofactor y por tanto las reacciones bioquímicas. Segundo, el ser humano difiere en la disponibilidad de los alimentos debido a diferencias culturales, geográficas y económicas, por tanto, los mejores resultados de salud se pueden lograr si los requerimientos nutricionales son personalizados considerando sus características genéticas, etapa de vida, preferencias alimentarias y estado de salud. Tercero, la dieta puede afectar directamente a la expresión de genes en las rutas metabólicas e indirectamente sobre la estabilidad del genoma; ésta alteración puede generar cambios o mutaciones en el genoma provocando expresiones genéticas erróneas o diferentes (Marti, 2005; Ridner y col., 2009; Fenech y col., 2011).

En diferentes animales de laboratorio como ratones, peces y crustáceos, se han realizado estudios de expresión de genes modificados por la dieta. Así, López y col., (2003, 2004) comparó el patrón de expresión de genes en el tejido adiposo de animales sometidos a una dieta estándar o rica en grasa mediante *differential display* y *microarrays*. En peces, se observó que los aceites vegetales incluidos en la dieta afectan la expresión de los genes del metabolismo de los lípidos (Pratoomyot y col., 2008; Menoyo y col., 2003; Zheng y col., 2004, 2005) y en *Litopenaeus vannamei shrimp* Chávez-Calvillo y col., (2010) evaluó los cambios en la expresión de genes como respuesta al cambio de dieta de proteínas animales a proteínas vegetales.

1.3.1. Influencia del Estrés en la Expresión Génica.

En la acuicultura, el estrés es uno de los problemas más importantes que afectan a la producción piscícola consecuencia de prácticas o agentes estresantes como alimentación deficiente, baja oxigenación del agua, fotoperiodo (Polakof y col., 2007), ambiente (Roche y Bogé, 1996), densidad del cultivo (Binuramesh y col., 2005), manipulación, selección y transporte (Iwama y col., 2004) Todos estos factores inducen a una serie de respuestas fisiológicas y normalmente involucran a todos los niveles de la

organización animal. Generalmente no ocasionan la muerte, pero sí inciden negativamente en diferentes aspectos de su biología como el crecimiento, la reproducción o el sistema inmunitario (Nakano, 2011; Prunet, y col., 2012; Iwama, y col., 2006; Sánchez-Muros y Gómez-Milán, 2001).

Diversos estudios han comprobado que el metabolismo de los peces pueden verse afectado por factores como la actividad física (Lushchak y col., 2001) y la estrategia de alimentación composición de la dieta (Pérez Jiménez y col., 2009; Enes y col., 2009), privación o restricción de la ración (Pérez Jiménez y col., 2009) y reducción de la frecuencia de alimentación (Nakagawa y col., 1995).

Las respuestas fisiológicas, en peces como en otros vertebrados, respecto al crecimiento, la reproducción celular y la regeneración se encuentran regulados por una variedad de hormonas que actúan a través del sistema endocrino. La hormona de crecimiento (GH), producida por la adenohipófisis y liberada al torrente sanguíneo, es el encargado de estimular al hígado en la síntesis de los factores de crecimiento insulínico tipo 1 y tipo 2 (IGF-I, IGF-II) (Kajimura y col., 2001; Pierce y col., 2004). Los factores de crecimiento insulínico IGF-I y IGF-II juegan un papel importante en el crecimiento, aunque es el IGF-I el que ha demostrado ser el principal indicador y regulador positivo del crecimiento muscular en peces (Vera Cruz, y col., 2006).

Es lógico comprender que en la práctica acuícola es prioritario conseguir eliminar cualquier fuente de estrés, de hecho, conocer la frecuencia óptima de alimentación o tasa de alimentación es imprescindible en el cultivo de peces (García Mesa y col., 2014), esto evitará la sobrealimentación y con ellos los residuos de alimentos que alteran la calidad del agua (Ng y col., 2000) o el inadecuado suministro que tienen un impacto directo sobre el costo de la producción (Mihelakakis y col., 2002).

1.3.2. Influencia de la Dieta en la Regulación de la Expresión Génica

En los últimos años, diversos estudios han analizado la influencia de los componentes de la dieta sobre la regulación de la expresión de los genes que codifican enzimas fundamentales en vías metabólicas específicas (Morais y col., 2011, 2012a, 2012b., Daimiel y col., 2012). Por ejemplo, se ha descrito como los nutrientes activan factores de transcripción, y favorecen la síntesis de receptores en las rutas metabólicas o intervienen positiva o negativamente en rutas de señalización (Kaput y Rodríguez, 2004., Xue y col., 2015).

Estudios epidemiológicos, han encontrado asociaciones entre la dieta y la expresión de genes que codifican ciertas enfermedades (Stover, 2004), pero, encontrar el componente responsable de esta interacción es muy complejo ya que los alimentos contienen muchos de ellos y cualquiera puede ser el responsable del efecto observado. Entre las investigaciones que demuestran esta influencia podemos mencionar dos estudios realizados sobre la tasa de mortalidad entre individuos vegetarianos y no vegetarianos y la evaluación de individuos con dieta vegetariana durante 17 años. En ambos trabajos se demostró que los vegetarianos tienen una tasa de mortalidad menor que los no vegetarianos debido a la reducción de las enfermedades crónicas. (Key y col., 1996; 1998).

Otros componentes de la dieta pueden también alterar eventos genéticos y epigenéticos y, de esa manera influir en la salud. Además de elementos como el calcio, zinc, selenio, folato y vitaminas C y E, hay una variedad de nutrientes no esenciales y componentes bioactivos que parecen influenciar significativamente la salud al modificar un número de procesos celulares asociados con salud y prevención de enfermedades, incluyendo metabolismo de carcinógenos, el balance hormonal, el señalamiento celular, el control del ciclo celular, la apoptosis, y la angiogénesis. A menudo los componentes bioactivos modifican varios procesos simultáneamente. Por ello, uno de los desafíos reales es la identificación de cuáles de dichos procesos, tanto por separado o en combinación, son importantes en determinar un cambio fenotípico (Trujillo, y col., 2006).

1.3.3. Los ácidos grasos poliinsaturados en la expresión de los genes.

Durante los últimos años se ha hecho evidente que las dietas grasas son capaces de modular directamente o indirectamente, a través de diversas vías de señalización, la activación o la represión de un gen o de un grupo de genes y de enzimas que participan en diferentes vías metabólicas. Esta interacción gen-nutriente tiene efectos importantes sobre el metabolismo y la diferenciación celular así como en el crecimiento, desarrollo, salud y bienestar de los mamíferos (Jump y Clarke, 1999; Duplus y col., 2000; Clarke, 2001).

Hace 40 años, Allman y Gibson (1969) observaron que en ratones alimentados con dietas que contenían ácido LA disminuía la síntesis de ácidos grasos de cadena larga y por consiguiente la actividad de algunas enzimas que participan en el proceso. Años más tarde las investigaciones confirmaron que las dietas ricas en PUFA (no así los ácidos grasos saturados palmítico u oleico) disminuyen la producción de diversas enzimas hepáticas, que incluyen enzima a la Sintasa de ácidos grasos, L-Piruvato quinasa (Clarke y col.,1990), Acetil-CoA carboxilasa (Salati y Clarke, 1986), Glucoquinasa, Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Jump y Clarke, 1999), ATP Citrato liasa, enzima Málica, delta 9 estearoil-CoA desaturasa (Ntambi, 1992; Landschulz, y col., 1994; Sessler y Ntambi, 1998; Jump y Clarke, 1999), delta-6 desaturasa (Cho y col., 1999a), delta-5 desaturasa (Cho y col., 1999b) y glucosa transportador 4 (Tebbey y col., 1994) involucradas en el metabolismo de la glucosa, síntesis de lípidos y metabolismo y transporte de ácidos grasos (Clarke, 2001).

Actualmente se conoce que la forma de regular la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de los lípidos se realiza de forma directa mediante la interacción con receptores nucleares como PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), RXR (Retinoid X Receptor), LXR (Liver X Receptor), HNF-4 (Hepatic Nuclear Factor) o de forma indirecta a través de cascadas de señalización que a su vez alteran la actividad de factores de transcripción: SREBP-1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein-1), ChREBP (Carbohydrate Regulatory Element Binding Protein) y MLX (Max-

Like Factor X) (Stulnig, 2003; Pégorier y col., 2004; Jump, 2008; Jump y col., 2008, He y col., 2015).

1.3.4. Técnicas para la detección de la expresión génica.

La expresión génica es el proceso por el que la información de un gen es usada en la síntesis de un producto génico funcional. Estrictamente el término abarca desde la activación del gen hasta que la proteína madura se localiza en el lugar adecuado y realiza su función (Hernandez y col., 1994). En todos los organismos vivos las células regulan sus actividades activando o desactivando la expresión de sus genes y esta expresión es la respuesta a distintos estímulos y es generalmente proporcional al número de copias de ARN mensajero de un gen determinado.

Actualmente existen varias técnicas para el estudio de la expresión génica que son la base del desarrollo de la genética funcional. Algunas son más precisas y de alta productividad como la qRT-PCR (Quantitative RetroTranscription Polimerase Chain Reaction) o RT-PCR (Retro Transcription Polimerase Chain Reaction) a tiempo real y los Microarrays, la secuenciación de ESTs (Fragmentos cortos de ADNc - Expressed Sequenced Tags), SAGE (Análisis en serie de la Expresión Génica - Serial analysis gene expression) y SSH (hibridación sustractiva por supresión - Suppression subtractive hybridization). Otro grupo de técnicas como *Differential Display*, AFLP (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados - Amplified fragment length polymorphism), RDA (Análisis Diferencial Representativo - representational differential analysis), GeneCalling, TOGA (Total Gene Expression Analysis) y son utilizadas cuando no se tiene información o conocimiento previo del genoma.

1.3.4.1. *Differential Display*

Es una de las primeras técnicas que permiten una rápida, económica y sensible detección de genes cuya expresión ha sido modulada. Fue desarrollada y patentada en 1992 por los Drs. Arthur Pardee y Peng Liang. (Liang y Pardee, 1992).

La técnica consiste en generar a partir del ARNm de cada muestra, su ADN codificante (ADNc) correspondiente y este es amplificado por PCR utilizando cebadores

arbitrarios degenerados combinados con cebadores de anclaje poli-T. El producto de esta amplificación es un patrón de bandas (para cada individuo o grupo de estudio) que se visualizan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y representan al ARNm presente en los tejidos procesados (Figura 1.7) El objetivo de todo este proceso es encontrar bandas diferenciadas entre los grupos contrastados que posteriormente podrán aislarse del gel y secuenciarse para identificar a que gen representa dicho ARNm (Liang y Pardee, 1998; Liang, 2002; Stein y Liang, 2002).

La gran ventaja de esta técnica frente a otras de análisis de expresión, como los microarrays o los chips de ARN, es que no se requiere un conocimiento previo del genoma de la especie a estudio, es decir, se trata de una técnica abierta cuyo objetivo es detectar genes cuya expresión sea diferente entre los grupos de contraste, aunque estos genes no estén anotados o no se hayan relacionado anteriormente con el carácter a estudio. Es además una técnica muy flexible, económica y fácil de desarrollar y modificar en el laboratorio con el fin de obtener mejores resultados (Alves-Costa y Wasko., 2015).

El mayor inconveniente de esta técnica es la gran cantidad de falsos positivos que puede generar, que pueden alcanzar el 50% (Martin y Pardee, 2000); sin embargo, un diseño y una ejecución cuidadosos puede reducir esta tasa hasta el 0,1%.

Esta técnica ha sido utilizada en diferentes estudios de expresión génica en utilizando diversos tejidos (cerebro, músculo, hígado, hepato-páncreas) con resultados interesantes (Vicent y col., 1998; Lee y col., 1999; Adam y col., 2000; Niemann y col., 2000, Chávez-Calvillo y col., 2010).

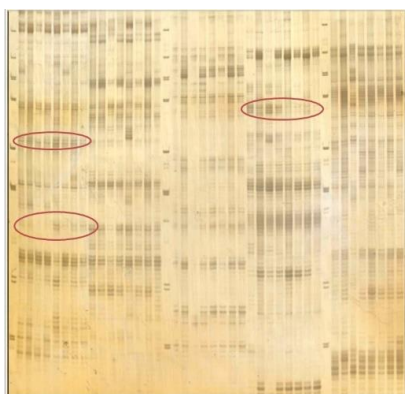


Figura 1.7. Gel de poliacrilamida: *Differential Display*

1.3.4.2. PCR a tiempo real

La técnica de PCR a tiempo real o PCR cuantitativa es una variación de la PCR estándar utilizada para el análisis de la expresión o la medida de la cuantificación de DNA o de RNA mensajero (mRNA), a través de la colecta de los valores que se generan durante la PCR, combinando la reacción de amplificación y la detección de la misma. Esto se puede llevar a cabo mediante la utilización de distintos agentes que emiten fluorescencia y que permiten asociar la concentración del producto de la PCR con la intensidad de la fluorescencia (Higuchi y col., 1993). La reacción está caracterizada por el punto en el tiempo o ciclo de la PCR donde la señal de amplificación o intensidad de fluorescencia del producto amplificado es significativamente mayor que la fluorescencia de fondo. A este ciclo de la PCR se le denomina Ciclo Umbral o Threshold Cycle (Ct) y determina el valor de expresión del gen. De manera que a mayor cantidad de ADN o ARN en el material de partida, antes aparece la señal de fluorescencia y menor es el Ct (Heid y col., 1996).

La reacción de PCR a tiempo real consta de cuatro fases: la fase de crecimiento lineal, la fase exponencial temprana, la fase exponencial propiamente dicha o fase lineal-logarítmica y la fase de meseta (Tichopad y col., 2003). Durante la fase de crecimiento lineal, que dura aproximadamente 10-15 ciclos, la reacción está comenzando y la emisión de fluorescencia por parte de las muestras no puede ser distinguida de la fluorescencia de fondo. Los valores de referencia de fluorescencia son calculados en esta fase. En el paso siguiente la fluorescencia emitida por las muestras aumenta 10 veces la desviación estándar de los valores de referencia superando un umbral, denominado Ct, con respecto a la fluorescencia de fondo (Heid y col., 1996). Durante la fase lineal-logarítmica la PCR alcanza su periodo de máxima amplificación, donde el producto de la reacción se duplicaría después de cada ciclo en condiciones óptimas. La fase de meseta comienza cuando los reactivos se agotan y la intensidad de la fluorescencia no aporta el cálculo de datos (Bustin y col., 2002).

Dos, son principalmente los métodos de cuantificación, dependiendo si la eficiencia de amplificación del gen objeto de estudio y el del gen de referencia son comparables, que se pueden llevar a cabo mediante la técnica de PCR a tiempo real.

✓ Cuantificación absoluta: Utiliza estándares diluidos de ADN de concentraciones conocidas para generar una recta patrón o curva estándar. La recta patrón relaciona linealmente el Ct con la cantidad inicial de ARN total o ADNc, permitiendo conocer la concentración de muestras desconocidas según su Ct (Heid y col., 1996). Este método asume que todas las muestras estándar y desconocidas poseen la misma eficiencia de amplificación (Souaze y col., 1996). La concentración de las diluciones seriadas debe ser similar a la concentración del resto de las muestras y permanecer en un rango detectable y cuantificable para el experimento y el aparato de detección (Wong y Medranno; 2005).

✓ Cuantificación relativa: Las variaciones de expresión de las distintas muestras para un gen se miden en función a los valores de una muestra estándar o gen de referencia, también conocido como “house-keeping gene” (Livak y col., 2001). El gen house-keeping es un calibrador, y los resultados son dados como la relación entre el valor de la muestra problema y el valor de esa muestra para el gen de referencia. Existen distintos modelos matemáticos para normalizar la expresión génica de forma relativa. Dependiendo del método empleado se pueden obtener distintos resultados con errores estándar distintos (Liu y Saint., 2002; Wong y Medranno; 2005).

1.3.4.3. qRT-PCR

La técnica de qRT-PCR, surge de la combinación de la PCR a tiempo real y una reacción de retrotranscripción o RT y se suele utilizar como método de validación y análisis de los niveles de expresión. A diferencia del *Differential Display*, es una técnica que requiere un conocimiento previo de los ARNm que se quiera detectar, por lo cual, es necesario diseñar cebadores específicos para los genes de interés de estudio.

Con el fin de obtener conclusiones exactas, es imprescindible estandarizar las técnicas de extracción y retrotranscripción, elaborando un diseño sólido del experimento y de las técnicas de normalización de resultados (Wong y col., 2005), ya que es una técnica sujeta a gran variabilidad debido a posibles diferencias de cantidad y calidad de los ARNs (Bustin y Nolan, 2004; Imbeaud y col., 2005), así como a variaciones en el rendimiento de la transcripción inversa (Bustin, 2002; Lekanne-Deprez y col., 2002). Pese a las desventajas mencionadas, es importante detallar también algunas de las ventajas de su aplicación respecto a otros métodos de análisis de expresión. Así tenemos:

- ✓ Genera datos cuantitativos en un registro preciso y dinámico del orden de 7 a 8 logaritmos (Morrison y col., 1998).
- ✓ No requiere la manipulación del producto después de la amplificación (Heid y col., 1996).
- ✓ Detecta diferencias de expresión entre dos muestras menores a un 23% (Gentle y col., 2001).
- ✓ Los coeficientes de variación son menores que en técnicas de densitometría de bandas e hibridación de sondas (Schmittgen y col., 2000).
- ✓ Discrimina entre secuencias casi idénticas de ARNm, y requiere menor cantidad de ARNm de partida que otros métodos de análisis de expresión (Wong y col., 2005).
- ✓ Es 1000 veces más sensible que las técnicas de cuantificación por hibridación de ARN (Marinen y col, 2003).

También es necesario considerar la elección de un gen de referencia o housekeeping y realizar con ellos medidas de expresión relativas. Estos genes deben ser de expresión estable y no regulada en todas las muestras analizadas, para corregir las variaciones en la eficiencia de la PCR entre muestras distintas y para normalizar la cantidad de muestra de partida de cada una de ellas. Es muy importante seleccionarlos teniendo en cuenta el tejido con el que trabajamos y validar su estabilidad en cada caso concreto.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La necesidad de reemplazar los aceites de pescado por aceites vegetales tratando al mismo tiempo de mantener la calidad que tiene el pescado desde el punto de vista de la salud humana, por su riqueza en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n3 de cadena larga, es una de las principales razones que han estimulado las investigaciones en este campo.

Por este motivo, el objetivo del estudio es el análisis de la expresión génica del transcriptoma de la Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) respecto a la frecuencia de alimentación y el reemplazo del aceite de pescado por aceites vegetales.

Los objetivos específicos serían:

1. Evaluar la influencia de la Frecuencia de Alimentación sobre los patrones de Expresión Génica en Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*).
2. Analizar los patrones de expresión de genes candidatos funcionales que intervienen en el metabolismo de los ácidos grasos en peces, en respuesta a las dietas basadas en aceites de origen vegetal como sustitutos del aceite de pescado.
3. Analizar los cambios de expresión de genes implicados en procesos de estrés en peces, en respuesta a las dietas basadas en aceites de origen vegetal como sustitutos del aceite de pescado.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Experimento 1: Influencia de la Frecuencia de Alimentación en la Expresión Génica.

3.1.1. Material Biológico

El material biológico del estudio consta de 16 muestras de cerebro, de tilapias (*Oreochromis niloticus*) de la línea *genetically male tilapia* o GMT® provenientes originalmente de una población de super machos (YY) y hembras (XX) de la empresa Fisguen SL (Swansee, Reino Unido), que fueron alimentados con pienso comercial específico de tilapia y mantenidos durante 23 días en cuatro tanques de 120 litros, con 15 peces por tanque y dos tanques por tratamiento. La frecuencia de alimentación fue ad libitum (comedero con péndulo) en dos de los tanques y los dos restantes fueron alimentados una única vez al día (Tabla 3.1).

Las muestras de tejido fueron conservados en tubos conteniendo RNA later® (Qiagen, SA) durante unas horas (12-24h) a temperatura ambiente y se congelaron posteriormente a -20°C hasta la extracción de ARN total.

Los peces fueron analizados para evaluar en que medida la reducción de la frecuencia de alimentación influye en la modulación de la expresión de los genes en situaciones de estrés.

Tabla 3.1. Distribución de peces según la frecuencia de alimentación.

Ad libitum		Una vez al día	
Tanque 1	Tanque 2	Tanque 3	Tanque 4
Pez T1.1	Pez T2.1	Pez T3.1	Pez T4.1
Pez T1.2	Pez T2.2	Pez T3.2	Pez T4.2
Pez T1.3	Pez T2.3	Pez T3.3	Pez T4.3
Pez T1.4	Pez T2.4	Pez T3.4	Pez T4.4

3.2. Experimento 2: Influencia de los Ácidos Grasos Poliinsaturados en la Expresión Génica

3.2.1. Material Biológico

El material biológico del estudio constó de 24 muestras de músculo e hígado de tilapias (*Oreochromis niloticus*) de la línea *genetically male tilapia* o GMT® provenientes originalmente de una población de super machos (YY) y hembras (XX) de la empresa Fisguen SL (Swansee, Reino Unido). Los peces fueron alimentados tres veces al día usando un alimentador programable (EHEIM 3581). Se utilizaron 4 dietas basadas en aceite de lino (AcL), aceite de girasol (AcG), aceite de pescado (AcP) y aceite de girasol alto oleico (AcGAO) para cada tratamiento experimental (Tabla 3.2). Los peces permanecieron un periodo de 2 meses en tanques de 120 litros con 1 pez por tanque y seis tanques por tratamiento.

Las muestras de tejido fueron conservados en tubos conteniendo RNA later® (Qiagen, SA) durante unas horas (12-24h) a temperatura ambiente y se congelaron posteriormente a -20°C hasta la extracción de ARN total.

Los peces fueron analizados para evaluar en qué medida los piensos basados en aceites vegetales influyen en la expresión de los genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos.

Tabla 3.2. Distribución de peces según las dietas experimentales.

Aceite de Lino		Aceite de Girasol		Aceite de Pescado		Aceite de Girasol Alto Oleico	
Hígado	Músculo	Hígado	Músculo	Hígado	Músculo	Hígado	Músculo
Pez E1	Pez E1	Pez F2	Pez F2	Pez G1	Pez G1	Pez H2	Pez H2
Pez E3	Pez E3	Pez F4	Pez F4	Pez G3	Pez G3	Pez H4	Pez H4
Pez E5	Pez E5	Pez F6	Pez F6	Pez G5	Pez G5	Pez H6	Pez H6

3.3. Extracción, Valoración y Conservación de ARN

A partir del tejido conservado a -20° , se realizó la extracción del ARN total, mediante el kit de Extracción RNeasy® Midi Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo descrito para muestras tisulares. La cantidad de tejido utilizado para la extracción dependió del tejido a utilizar: 20mg para cerebro, 100mg para hígado y 200mg para músculo. Durante el protocolo de aislamiento de ARN total se procedió a realizar un tratamiento con DNasa (RNase-Free DNase Set, QIAGEN) para la eliminación del ADN.

La integridad del ARN extraído fue evaluado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en buffer TBE1X (Tris-HCl 90mM, ácido bórico 90mM, EDTA 2mM pH=8), bajo un campo eléctrico de 90V durante 20 minutos (Figura 3.1) Se visualizaron las bandas correspondientes al ARN ribosómico 28S y 18S, lo que da una idea de la integridad del ARN extraído y del rendimiento de la extracción. La concentración se determinó mediante espectrofotometría midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260nm (A_{260}). A esta longitud de onda una absorbancia de 1 unidad corresponde a una concentración de 40 ng/ μ l. El ratio A_{260} / A_{280} estima la pureza del ARN con respecto a contaminantes como las proteínas. Las medidas fueron tomadas en Tris-HCl 10mM pH=7,5. Valores entre 1,8 y 2 indican que el ARN está libre de impurezas.

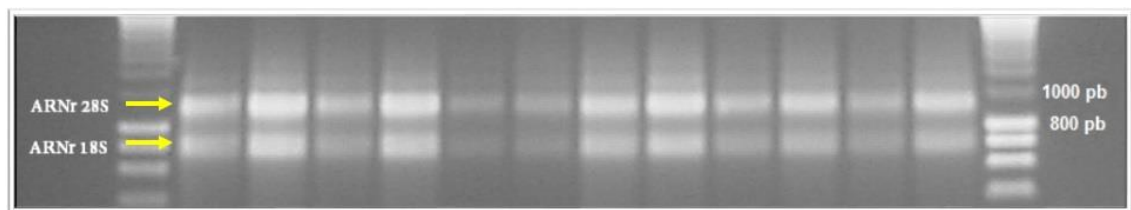


Figura 3.1. Electroforesis en agarosa al 1,5%. Se observan las bandas de los ARN 28S y 18S. En el carril izquierdo el marcador de peso molecular. Se observan los marcadores de peso molecular en los carriles laterales.

Al ARN obtenido se le añadió un inhibidor de RNasas (*RNA-secure*™, Ambion) según las instrucciones del producto, posteriormente se alicuotó en pequeñas cantidades y conservamos a -70°C hasta su posterior utilización.

3.4. Differential Display

Esta técnica, empleada para el análisis de expresión, se realiza en varios pasos, que incluyen una reacción de retrotranscripción para la obtención de ADNc, la amplificación de fragmentos utilizando cebadores aleatorios mediante PCR y la separación de los productos de la PCR mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y su posterior tinción de plata para la observación de los fragmentos.

Para realizar los experimentos se emplearon *pooles* de ARN de cada uno de los tratamientos. En la tabla 3.3 se describen las 8 muestras (marcadas por una circunferencia) que finalmente (luego de la extracción de ARN en pooles) fueron utilizadas con la técnica de *Differential Display* en el experimento 1. De igual manera, tanto para muestras de músculo como de hígado, podemos observar en la tabla 3.4 las 4 muestras (y las que las componen) que fueron utilizadas en el experimento 2.

Tabla 3.3. Pooles de ARN según la frecuencia de alimentación y tanques de procedencia. Las circunferencias muestran las muestras finales de ARN por tratamiento experimental.

Ad libitum		Una vez al día	
Tanque 1	Pez 1	Pez 1	Pez 1
	Pez 2	Pez 2	T3 – P1
	Pez 3	Pez 3	Pez 3
	Pez 4	Pez 4	T3 – P2
Tanque 2	Pez 1	Pez 1	Pez 1
	Pez 2	Pez 2	T4 – P3
	Pez 3	Pez 3	Pez 3
	Pez 4	Pez 4	T4 – P4

Tabla 3.4. Pooles de ARN según el tipo de ácido graso de la dieta. Las circunferencias muestran las muestras finales de ARN por tratamiento experimental.

Aceite de Lino	Aceite de Girasol	Aceite de Pescado	Aceite de Girasol Alto Oleico
E1	F2	G1	H2
E3	F4	G3	H4
E5	F6	G5	H6

P 1

P 2

P 3

P 4

3.4.1. Reacción de retrotranscripción

A partir del ARN extraído previamente se realizó la reacción de retrotranscripción o transcripción inversa, mediante la retrotranscriptasa iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIORAD). En esta reacción las moléculas de ARN son copiadas a moléculas de ADN codificante (ADNc). El ADNc, no contiene intrones, pero es una molécula más estable, que requiere unas condiciones de trabajo menos restrictivas. El protocolo y programa de amplificación para la realización de la reacción se detalla en las Tablas 3.5 y 3.6.

Tabla 3.5. Protocolo de la reacción de transcripción inversa.

	Volumen por
MIX	4µl
Retrotranscriptasa	1µl
ARN	2µl
H₂O	13µl

Tabla 3.6. Programa de amplificación de la reacción de transcripción inversa.

Temperatura (°C)	Tiempo
25°C	5 minutos
42°C	40 minutos
85°C	6 minutos
4°C	∞

3.4.2. Amplificación del ADNc

Después de la reacción de retrotranscripción y una vez obtenido el ADNc, se realizó la amplificación de fragmentos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando distintas combinaciones de cebadores poli-T (Tabla 3.7) que consisten en una cola poliT, que se une específicamente a las colas de poliadenilación (poliA) presentes en todos los ARNm. Los cebadores, en el extremo 3', presentan un nucleótido de los otros tres posibles (A, G o C), de manera que divide el ARNm en subpoblaciones, dependiendo del nucleótido que precede a la cola de poliA, generando así un número manejable de cDNAs. El cebador tiene además incorporada una secuencia en el extremo 5' de 17 nucleótidos derivada del promotor de T7 que va a permitir la secuenciación posterior sin necesidad de subclonar. T7 es un bacteriófago de ciclo lítico, de genoma conocido, y es utilizado habitualmente como sistema de clonado.

Además de los cebadores poli-T, se añade a la reacción cebadores arbitrarios (Tabla 3.8) para que la PCR pueda llevarse a cabo. Estos cebadores son aleatorios; cada uno tiene 10 nucleótidos para unirse al ADNc e incorpora 16 nucleótidos en 5' que corresponden al cebador universal M13 inverso para permitir la secuenciación del fragmento obtenido sin necesidad de subclonar. M13 es otro bacteriófago utilizado como sistema de clonado.

De esta forma se realizaron en total 60 RT-PCRs para cada muestra a estudio por combinación de los tres cebadores inversos combinados con cada uno de los 20 cebadores aleatorios.

Tabla 3.7. Secuencias de los cebadores poli-T utilizados en *Differential Display*.

Cebador	Secuencia
T7(dT₁₂)A	5'-ACG ACT CAC TAT AGG GCT TTT TTT TTT TT A -3'
T7(dT₁₂)C	5'-ACG ACT CAC TAT AGG GCT TTT TTT TTT TT C -3'
T7(dT₁₂)G	5'-ACG ACT CAC TAT AGG GCT TTT TTT TTT TT G -3'

Tabla 3.8. Secuencias de los cebadores arbitrarios utilizados en *Differential Display*.

Cebador	Secuencia
M13-ARP1	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ACG ACT CCA AG-3'
M13-ARP2	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGC TAG CAT GG-3'
M13-ARP3	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGA CCA TTG CA-3'
M13-ARP4	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGC TAG CAG AC-3'
M13-ARP5	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AAT GGT CGT CT-3'
M13-ARP6	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATA CAA CGÁ GG-3'
M13-ARP7	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATG GAT TGG TC-3'
M13-ARP8	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATG GTA AAG GG-3'
M13-ARP9	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATA AGC CTA GC-3'
M13-ARP10	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ACA GTG TGT GA-3'
M13-ARP11	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AAC GCT AGT GT-3'
M13-ARP12	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGG TAC TAA GG-3'
M13-ARP13	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGT TGC ACC AT-3'
M13-ARP14	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATC CAT GAC TC-3'
M13-ARP15	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ACT TTC TAC CC-3'
M13-ARP16	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATC GGT CAT AG-3'
M13-ARP17	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ACT GCT AGG TA-3'
M13-ARP18	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATG ATG CTA CC-3'
M13-ARP19	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATT TTG GCT CC-3'
M13-ARP20	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATC GAT ACA GG-3'

La reacción de PCR se llevó a cabo con la transcriptasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystem) utilizando un termociclador PTC200 (MJ Reserch) según las condiciones detalladas en Tablas 3.9 y 3. 10.

Tabla 3.9. Concentración inicial, Concentración final y Volúmenes de la reacción de amplificación.

	[INICIAL]	[FINAL]	VOLUMEN
Buffer	10x	1x	1μl
Cl₂Mg	25mM	2mM	0,8μl
dNTPs	10mM	1mM	1μl
Cebador dT	10μM	1μM	1μl
Cebador arbitrario	10μM	1μM	1μl
Taq Gold	5U/μl	1U	0,1μl
ADNc			2μl
H₂O			3,1μl

Tabla 3.10. Protocolo de amplificación de RT-PCR para *Differential Display*

		1 ciclos			2 ciclos			30 ciclos				
Temp.	95º	94º	40º	72º	92º	40º	72º	94º	58º	72º	72º	15º
Tiempo	8min	4min	5min	5min	1min	1min	5min	30seg	30seg	2min	7min	∞

3.4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La composición del gel de poliacrilamida consistió en Acrilamida-bisacrilamida en una proporción 19:1 6%, Urea 7M, TBE 0,5X, Persulfato Amónico 0,5% y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina) 0,5%. Esta solución fue depositada entre dos cristales tratados uno con una capa de Bind Silane (Amersham-Pharmacia), que facilita la posterior recuperación del gel, y otro cristal con una solución Repel (Amersham-Pharmacia), que aseguró que el gel no se quedará adherido a este cristal. El buffer de electroforesis utilizado fue TBE 1x.

Una vez polimerizado el gel fue sometido a un calentamiento previo mediante una corrida electroforética de 45 minutos a 90W.

Los fragmentos de PCR fueron separados mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.

Utilizando 5ul tampón de carga consistente en EDTA 0,5M pH=8, Xilén-cyanol 0,05% y Azul de bromofenol 0,005% y temperatura de 95°C durante 5 minutos, los fragmentos fueron desnaturalizados y cargados en el gel de poliacrilamida. Las condiciones de electroforesis fueron: 4h a 60W y entre 1350-1500V.

3.4.4. Tinción y Revelado

La observación de los fragmentos amplificados diferencialmente se realizó sometiendo al gel a un proceso de tinción con nitrato de plata, basado en el protocolo de Bassam y col. (1991) con ligeras modificaciones:

- ✓ Fijación del gel en una solución de ácido acético al 10% durante 3 minutos.
- ✓ Lavado con H₂O MiliQ.
- ✓ Tinción (AgNO₃ 0,2%; Formaldehído 37%) con agitación y oscuridad durante 20 minutos.
- ✓ Lavado del gel con H₂O MiliQ.
- ✓ Revelado con una solución que contiene Carbonato sódico (Na₂CO₃) 0,07M, Tiosulfato sódico (Na₂S₂O₃x5 H₂O) al 1%, Formaldehído al 37%, hasta la visualización de las fragmentos de la PCR en forma de bandas.
- ✓ Lavado con H₂O MiliQ.

- ✓ Detención del revelado con Ácido acético glacial al 10% durante 3 minutos.
- ✓ Lavado con H₂O MiliQ y solución con Glicerol al 0,5% para su posterior conservación.
- ✓ El gel revelado es separado del cristal y envuelto entre dos hojas de papel celofán hasta su secado total.

3.4.5. Selección de las bandas diferencialmente expresadas

Se seleccionaron fragmentos o bandas en las cuales se apreciaba diferencia de intensidad, ausencia o presencia entre los distintos grupos de muestras o de animales previamente establecidos. Para confirmar que no se trataba de artefactos de la PCR o amplificaciones inespecíficas, se repitieron los grupos o experimentos en los que se observaba diferencias de expresión (Figura 3.2)

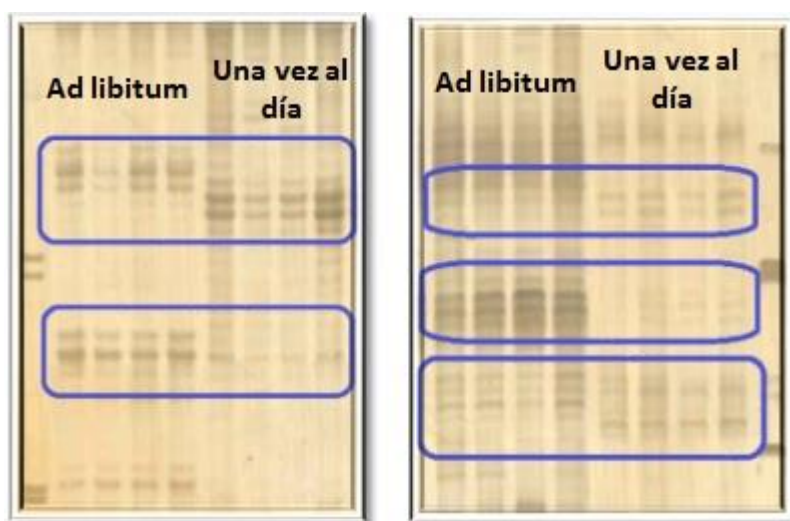


Figura 3.2. Geles *Differential Display* RT-PCR en gel al 6% de poliacrilamida teñido con nitrato de plata. Los fragmentos que pueden corresponder a transcritos diferencialmente expresados se encuentran dentro del marco.

3.4.6. Reamplificación de las bandas diferenciales

Las bandas seleccionadas se recortaron del gel de poliacrilamida, utilizando lupa y bisturí. Una vez aislada se introdujo en un tubo eppendorf con 80-100ul de agua MilliQ y se sometió a un tratamiento de choque térmico, según el siguiente protocolo:

- ✓ Someter los tubos conteniendo las bandas a 95°C durante 15 minutos.
- ✓ Mantenerlos a -70°C durante 15 minutos.
- ✓ Permitir la descongelación a temperatura ambiente.
- ✓ Volver a congelar a -70°C durante 15 minutos.
- ✓ Descongelar a temperatura ambiente.
- ✓ Centrifugar 10000 rpm durante 1 minuto inmediatamente antes de su uso para la reacción de reamplificación. Conservar a -20°C.

La reamplificación de las bandas se realizó con AmpliTaq Gold (*Applied Biosystems*) utilizando el mismo par de cebadores con el que se realizó la RT-PCR de *Differential Display* (tablas 3.11 y 3.12); la presencia en los cebadores de las colas T7 y M13 evita los procesos de clonación para obtener la secuencia de los genes diferencialmente expresados.

Tabla 3.11. Concentración inicial, concentración final y volúmenes de la reacción de reamplificación.

	[INICIAL]	[FINAL]	VOLUMEN
Buffer	10x	1x	1μl
Cl₂Mg	25mM	1,5mM	0,6μl
dNTPs	10mM	0,2mM	0,2μl
Cebador dT	10μM	1μM	1μl
Cebador arbitrario	10μM	1μM	1μl
Taq Gold	5U/μl	1U	0,1μl
Solución de banda recuperada			3μl
H₂O			3,1μl

Tabla 3.12. Protocolo de la reacción de reamplificación.

		25 ciclos				
Temp.	95º	95º	60º	72º	72º	15º
Tiempo	5seg	15seg	15seg	15seg	7seg	1min

Para evidenciar la reamplificación de las bandas se utilizaron geles de agarosa (1.5%) y/o poliacrilamida [acrilamida-bis-acrilamida (19:1) al 8-12%, TBE 0'5X, Persulfato amónico 0'5% y TEMED 0'05%]. Es necesario asegurarse que obtenemos una sola banda y del tamaño esperado ya que habitualmente se obtienen bandas dobles o múltiples debido a reamplificaciones inespecíficas, contaminaciones o presencia de bandas solapadas o artefactos generados durante la reamplificación. En estos casos es necesario aislar la banda correcta mediante separación en geles poliacrilamida, volver a reamplificar para posteriormente secuenciar.

3.4.7. Secuenciación y Purificación de la PCR de secuenciación

Una vez obtenida una banda única y en cantidad suficiente, se purificó el producto de PCR mediante un protocolo de purificación en columna (High Pure PCR Product Purification kit, Roche), con el objetivo de eliminar cualquier resto de los reactivos de la PCR.

La reacción de secuenciación se realizó en un termociclador PTC200 (MJ Research) utilizando ABI PRISM BigDye® Terminador v3.1 Cycle Sequencing Kit y el mismo cebador arbitrario con el cual se obtuvo cada una de las bandas en *Differential Display* (Tablas 3.13 y 3.14).

Tabla 3.13. Condiciones de la reacción de secuenciación.

	Volumen
Mix BigDye	2 µl
Cebador (10mM)	0,5 µl
H2O	2 µl
PCR Purificada	6 µl

Tabla 3.14. Programa de la reacción de secuenciación.

		30 ciclos				
Temp.	96º	96º	55º	60º	60º	15º
Tiempo	30seg	30seg	15seg	4min	4min	∞

Una vez terminada la PCR de secuenciación, el producto se purificó para eliminar residuos tales como sales y restos de terminadores que pueden afectar a la señal fluorescente siguiendo el siguiente protocolo:

- ✓ Añadir por cada 10µl de PCR de secuenciación: 1,5µl de Acetato sódico 3M pH=4,6, 31,25µl de Etanol 100%, y 7,5µl de H₂O.
- ✓ Mantener 15 minutos a 4ºC para que precipiten los productos de extensión de la PCR.
- ✓ Centrifugar 30 minutos a 13000rpm. Eliminar el sobrenadante.
- ✓ Añadir 250µl de Etanol 75%.
- ✓ Centrifugar 15 minutos a 13000rpm. Eliminar el sobrenadante y permitir el secado.

Por último se añadieron 15µl de formamida y se sometió a una electroforesis capilar utilizando un secuenciador automático ABI Prism 3130XL (Applied Biosystems). Una vez finalizada la electroforesis los resultados se analizaron con el programa Sequencing Análisis Software (Applied Biosystems), que genera un electroferograma y una secuencia nucleotídica.

3.4.8. Análisis de las secuencias e identificación de genes diferencialmente expresados

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se analizaron con el programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) que compara las secuencias nucleotídicas, en las principales bases de datos de ADN y ARN presentes en la web:

- ✓ NCBI (National Centre of Biotechnology Information), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- ✓ UCSC Genome Bioinformatics (University of California Santa Cruz Genome Bioinformatics); <http://genome.ucsc.edu/>
- ✓ TIGR (The Institute of Genomic Research); <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>

3.5. qRT-PCR

Esta técnica permite la confirmación de la expresión diferencial de los genes encontrados mediante Differential Display, es decir, para comprobar si realmente existe una diferencia de expresión en los genes identificados y para cuantificar dichas diferencias. Además, se utiliza para medir la expresión de otros genes candidatos funcionales que han demostrado tener alguna relación con el metabolismo de lípidos.

El material de partida de esta técnica fue el ARN total de cada uno de los animales a estudio que fue retrotranscrito a ADN codificante (ADNc). En el caso del experimento 1, fueron retrotranscritos y analizados pooles de ARN de cada uno de los tratamientos, contruidos a partir de 2µl de cada individuo. La reacción se llevó a cabo en el termociclador iCycler TN (BIORAD), empleando DyNAmo™ HS SYBR® Green qPCR Kit (FINNZYMES) que contiene el fluoróforo SybrGreen. Las reacciones se hicieron por duplicado para cada individuo y gen. Se incorporaron controles negativos al experimento, con los mismos componentes de reacción pero sin sustrato. Las cantidades empleadas y el programa del termociclador se describen en las Tablas 3.15 y 3.16.

Tabla 3.15. Concentración inicial, Concentración final y Volúmenes de la PCR.

	[Inicial]	[Final]	Volumen
MIX	10x	1x	10 µl
Cebador Forward	10µM	0,5µM	0,5 µl
Cebador Reverse	10µM	0,5µM	0,5 µl
ADNc			2 µl
H₂O			7 µl

Tabla 3.16. Programa de amplificación de la PCR cuantitativa.

		45 ciclos					155 ciclos		
Temp	95º	95º	55-68º *	72º	95º	68º	68º		15º
Tiempo	8seg	15seg	30seg	40seg	4min	1min	2seg* *+0,2º/C		1min

El último paso del programa de temperaturas permite la construcción de una curva de meeting con la que se comprobó la amplificación del fragmento esperado. La fluorescencia emitida fue cuantificada dando una medida de la cantidad amplificada.

3.5.1. Genes Cuantificados: Diseño de cebadores

Para poder llevar a cabo la qRT-PCR fue necesario diseñar cebadores específicos para una serie de genes candidatos cuya expresión se encuentre influenciada por los ácidos grasos poliinsaturados (metabolismo de los ácidos grasos, estrés y acción hormonal). Los datos de los genes utilizados se recogen en la tabla 3.17

Para el diseño, se utilizaron secuencias conocidas en las especies *O. mossambicus*, *Oryzias latipes*, *Maylandia zebra* y *Danio rerio*, utilizando los programas informáticos Primer 3 (Rozen y col., 2000), Operon; <https://www.operon.com/oligos/toolkit.php?> y DINAMelt (Markham y col., 2005). Con el fin de evitar que los cebadores generen estructura secundaria entre sí o con su pareja durante las reacciones de qPCR es conveniente tener en cuenta los siguientes requisitos:

- Tamaño del fragmento a amplificar debe situarse entre 100 y 200pb.
- Contenido de los cebadores en G/C > 50%
- Nula formación de dímeros o estructuras secundarias.
- Máxima especificidad, es decir, que de todo el genoma solo amplifique el gen en estudio.

Tabla 3.17. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación de genes funcionales.

Primer	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (3' - 5')	GenBank Acc.nº
ACLY	AGGTATGCCTGCCAGTTCATC	CCAATGGTGAGAAGGCCTG	XM_003442027.2
ACSL1	TCGAATCGGCTACTTCCAAGG	CAGTGGCGTGTGGCTTGA	XM_005457019
APOA1	CAAGCACACAGCTGAAATGGA	AGCAACCCTGGCACGAATAC	HE650127
ECH1	TGGAGAGATTGCTGGTCGC	GGCTGCCTGAGCTGATTTC	XM_005474839
EEF1a	TCGAGGCTGGTATCTCCAAGA	CATGTTGTCTCCGTGCCATC	AB075952
ELOVL6	CCATTGGTGCTGTGGTCACT	CAGGCCCGTTGTAGAAGCTC	XM_003443399
FAD6	GGCTGCAGCATGACTTTGG	AGTACCCACACAAACCAGTG	XM_003440472
FAS	CATCGACCGAGACTCACTGC	CATATTCGCTGCTGGTTTCG	GU433188
GHR	TGCTGAGTGGTAGAGGAATGG	TGACTGACAGGTTGGGACTG	EF052861
HNF4	TGAGCTGGTGCTTCCTTTCC	CGCATCCGCTTGATCTTTC	XM_004560279
HSP70	AAAAGGTGTCCAACGCTGTC	AGATGCCGTCTTCAATGGTC	FJ213839
HSP90	ATGCTGACAAGAACGACAAGG	AGGGGAGGAATCTCATCTGG	XM_013271984
IGF-I	GTCTGTGGAGAGCGAGGCTTT	GCGAGAAATCTTGGGAGTCTT	NM_001279503
IGF-II	GAAACCCAGCAAAGATACGG	GTTCTCCCCACACAGAGTC	NM_001279643
KRL	TGATGCCTACTGTCCAAGG	TTTCGGTCTGCAAGGATAGAG	AY495714S1
ME	ATGGCCATGGTGAAGGAGG	CATCTGTGGGTGCTCATGTG	XM_003453476
PPARα	CTCTTCCACTGCTGCCAGA	TGTCGTCCAGCTCCAGAGA	NM_001290066
PRLRa	CTGGCCCTTTCTTCGAGTGT	CGCTTTCCTCATCTCCAAC	L34783
SCD	CGTTAGGAGTCACTGCAGGA	TCCGAGTATTTGTGGTGAACC	XM_005471382
SREBP-1	CGTCCTTTCTTTCGGCTCC	AGCTGTTGGTGACGGTGGT	XM_005457771
USF1	CACTGTTACCGTCAACGAGGAA	CCGCTCCTTCTGTCTTGAACA	DB871616.1

ACLY ATP-citrate lyase, ACSL1 acyl-CoA synthetase long-chain family member 1, APOA1 apolipoprotein A-I, ECH1 enoyl Coenzyme A hydratase 1, peroxisomal, EEF1a Elongation factor 1-alpha, ELOVL6 elongation of very long chain fatty acids protein 6, FAD6 delta-6-fatty acid desaturase, FAS fatty acid synthase, GHR growth hormone receptor type 1, HNF4a hepatocyte nuclear factor 4, alpha, HSP70 Heat shock proteins, HSP90 Heat shock proteins, IGF-I Insulin-like growth factor I mRNA, IGF-II (Insulin-like growth factor II Mrna), KRL killer cell-like receptor, ME NADP-dependent malic enzyme, PPAR α Peroxisome proliferator-activated receptor α , PRLR Prolactin receptor α , SCD stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase), SREBP1 stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase), USF1 upstream transcription factor 1.

3.5.2. Construcción de la recta patrón

Para conseguir el correcto funcionamiento de la parejas de cebadores diseñadas, es necesaria la construcción de rectas patrón con cada una ellas. Para ello se realizó una qPCR a partir de diluciones seriadas de una muestra de ADNc molde diluido de forma seriada, de modo que se obtuvo una función de correlación entre la cantidad de ADNc inicial y la emisión de fluorescencia, comprobando que el aumento en la cantidad de amplicón es de tipo exponencial y función directa de la cantidad de ADNc inicial (Gibson y col., 1996). Se requiere un coeficiente de correlación (r^2) de al menos 0,95 y una eficiencia de la PCR de alrededor del 100% (95-105%) (Figura 3.3).

La recta patrón, es una manera de confirmar que la pareja de cebadores funciona y permite interpolar los datos de expresión que se obtienen en el experimento. En la mayoría de genes utilizados, se eligieron las diluciones 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} y 1×10^{-4} para generar la recta y se trabajó cada muestra por triplicado. La qPCR, genera además una curva de desnaturalización, disociación o melting (Figura 3.3), el hecho de visualizar un solo pico para todas las reacciones confirma que sólo existe un fragmento amplificado.

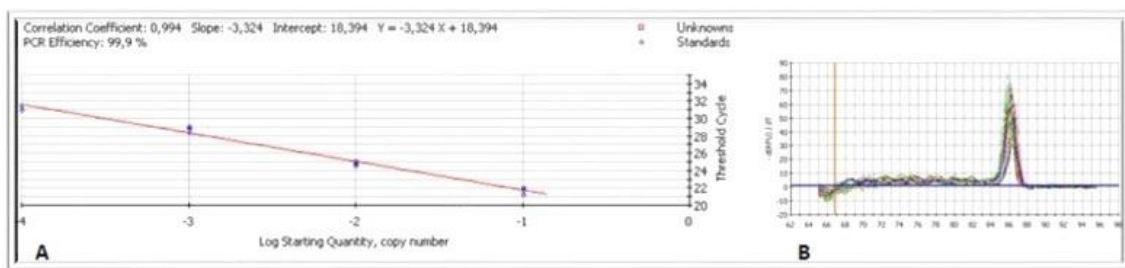


Figura 3.3. qRT-PCR: (A) Recta patrón y (B) Curva de disociación del gen EEF1 obtenida por diluciones seriadas de ADNc.

3.5.3. Genes de Referencia

La medida de la cantidad amplificada se referenció a la expresión de los genes “housekeeping”, Elongation factor 1-alpha (EEF1) y β -Actina, para normalizar las variaciones de expresión producidas por las diferencias en la extracción de ARN y en la eficiencia de la PCR entre muestras. Estos genes fueron seleccionados por su expresión invariable entre tejidos y tratamientos. También se construyó la recta patrón de cada uno de los genes de referencia.

3.5.4. Análisis de datos

Los datos se analizaron bajo un modelo lineal, considerando los resultados de expresión génica como la variable dependiente y como única variable independiente el tratamiento (en este caso cada grupo de muestras). El software REST© (Pfaffl y col., 2002) fue el elegido para el cálculo de la expresión relative del gen de interés. Este software toma en cuenta los cambios en las eficiencias de la amplificación y el “crossing point” (Cp) o “threshold point” (CT: ciclo umbral) que es considerado como el punto en el cual la reacción de amplificación da comienzo (punto en el cual la fluorescencia de la reacción sobrepasa la fluorescencia basal o umbral). De esta manera es posible calcular de manera precisa la expresión relativa del gen de interés con respecto al gen de referencia.

$$R = [(E_{\text{target gene}})^{\Delta CT_{\text{target gene (control-sample)}}}] / [(E_{\text{Ref}})^{\Delta CT_{\text{Ref (control-sample)}}}]$$

donde:

R: Expresión relative

E_{target} : eficiencia gen de interés

E_{Ref}: eficiencia del gen de referencia

$\Delta CT_{\text{target gene}}$: diferencia del CT del gen de interés del grupo control menos el CT del gen de interés del grupo experimental

ΔCT_{Ref} : diferencia del CT del gen de referencia del grupo control menos el CT del gen de referencia del grupo experimental

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Experimento 1: Influencia de la Frecuencia de Alimentación en la Expresión Génica

4.1.1. Expresión diferencial detectada en muestras de Cerebro por *Differential Display*.

De las 36 combinaciones analizadas entre cebadores de anclaje poliT y 12 cebadores arbitrarios (M13) (Tablas 3.5 y 3.6), se seleccionaron 31 bandas que manifestaron una expresión diferencial entre los grupos de contraste (alimentados una vez al día y ad libitum). La expresión diferencial se manifiesta por la presencia-ausencia o intensidad variable en la banda amplificada entre grupos de contraste (Figura 4.2). Las bandas seleccionadas se extrajeron del gel de poliacrilamida y previamente a su secuenciación fueron separadas en geles de poliacrilamada bajo condiciones no desnaturizantes para confirmar la presencia de una sola banda. De las 31 bandas inicialmente seleccionadas 19 no pudieron reamplificarse correctamente por diversas razones, no se produjo reamplificación, el amplicón producido no correspondía al tamaño esperado o se generaron múltiples amplicones que impidieron localizar la banda seleccionada en un primer momento y fue imposible aislarla para su secuenciación.

Las 12 secuencias reamplificadas se compararon haciendo uso de las principales bases de datos públicas, para determinar el gen al que correspondían. Los resultados evidenciaron secuencias que mostraron una elevada homología con un gen de función conocida, con fragmentos de una secuencia de función desconocida o no mostraron homología con ninguna secuencia de las bases de datos utilizadas.

En la tabla 4.1 se detallan las 10 secuencias que presentaron una elevada homología con una única secuencia, el gen al que corresponde (cuando se conoce), su función, el número de acceso de GenBank, la especie en la que está descrito dicho gen y el grupo experimental en el que aparece la banda diferencial.

Tabla 4.1. Resultados de anotación de las secuencias recortadas y reamplificadas para su identificación en muestras de cerebro de *O. niloticus*. La denominación del fragmento se basa en la combinación de cebadores del cual se obtuvo el fragmento y el tamaño del fragmento del gel del cual fue recuperado.

Banda	Gen	Función	Nº acceso GenBank	Especie	Grupo experimental
A7-400	Calcineurin subunit B type 1 (LOC101465581)	Proteína hipotética	XM_004538654	<i>Maylandia zebra</i>	Ad libitum
G3-250	CNTN3 (LOC100696343)	Proteína hipotética	XM_003442722	<i>O. niloticus</i>	Ad libitum
	CLIC6	Chloride channel 6	AF448438	<i>H.sapiens</i>	
G7-155	Desconocido	Desconocido			Ad libitum
G8-174	EPD1 (LOC100697993)	Proteína hipotética	XM_003456856	<i>O. niloticus</i>	Ad libitum
G8-170	sec5l1	Gen sec5like1 descrito en <i>S.cerevisiae</i>	BX927255, CK698666	<i>D.rerio</i>	Ad libitum
	CCHL1A2	Subunidad alpha-1 del canal de calcio tipo N	M94172	<i>H. sapiens</i>	Ad libitum
A9-300	ALOX5	Interviene en la síntesis de leucotrienos a partir de ac. Araquidónico	AL731567	<i>H. sapiens</i>	Ad libitum
G8-310	PLXNA4	Proteína hipotética.	XM_003445006	<i>O. niloticus</i>	Ad libitum
A9-250	16S ribosomal RNA	Transcripción de genes mitocondriales	GU370126	<i>O.niloticus</i>	Ad libitum
A2-123	Desconocido	Desconocido			Una vez al día
A2-186	Desconocido	Desconocido			Una vez al día

4.2. Experimento 2: Influencia de los Ácidos Grasos Poliinsaturados en la Expresión Génica.

4.2.1. Differential Display.

En los peces que fueron criados en cuatro grupos de estudio y alimentados con pienso compuesto por aceite de lino (AcL), aceite de girasol (AcG), aceite de girasol alto oleico (AcGAO) y aceite de pescado (AcP) se analizaron 60 combinaciones entre cebadores poliT (T7) y cebadores aleatorios. Se obtuvieron patrones de expresión distintos entre los tratamientos, tanto en muestras de músculo como de hígado. Todas las bandas seleccionadas como diferencialmente expresadas fueron extraídas de la matriz de poliacrilamida, reamplificadas y secuenciadas en caso de confirmarse como fragmento único y del tamaño esperado.

4.2.1.1. Muestras de músculo

Un total de 36 bandas fueron seleccionadas bien por su presencia-ausencia o por sus diferencias de intensidad entre los grupos analizados. Tras ser reamplificadas, 14 bandas fueron secuenciadas y analizadas haciendo uso de las principales bases de datos públicas. Dos fragmentos no pudieron ser identificados en las bases de datos debido a que no mostraron homología con ninguna secuencia, cinco fragmentos presentaron homología con más de una secuencia y dos fragmentos mostraron una elevada homología con un mismo gen como consecuencia de que el cebador arbitrario se une a distintas regiones del gen. En la Tabla 4.2 se detalla el resultado de las siete bandas restantes que fueron comparadas con las bases de datos públicas disponibles y mostraron una elevada homología con una única secuencia. En ella se indica el gen del que forman parte (cuando se conoce), su función, el número de acceso de GenBank con indicación de la especie en la que está descrito ese gen y el grupo experimental en el que aparece la banda diferencial.

Tabla 4.2. Resultados de anotación de las secuencias recortadas y reamplificadas para su identificación en muestras de músculo de *O. niloticus*. La denominación del fragmento se basa en la combinación de cebadores del cual se obtuvo el fragmento y el tamaño del fragmento del gel del cual fue recuperado.

Banda	Gen	Función	Nº acceso GenBank	Especie	Grupo experimental
C3-395 C3-267	Laminin, alpha3 variante X2 (LAMA3)	Proteína hipotética	XM_005476339.2	<i>O. niloticus</i>	Aceite de Lino
G2-200	STRIP1	Proteína hipotética	XM_003441269.3	<i>O. niloticus</i>	Aceite de Lino
C3-188	LOC102299338	Desconocida	XM_005920119.1	<i>Haplochromis burtoni</i>	Aceite de Lino
A8-221	GABARAPL1 (LOC100697001)	Proteína hipotética	XM_003450690.3	<i>O. niloticus</i>	Aceite de Girasol
G6-193	LOC106098112	Desconocida	XM_013270472	<i>O. niloticus</i>	Aceite de Girasol
C2-370	GAPDH	Proteína hipotética	XM_005455438.1	<i>O. niloticus</i>	Aceite de Pescado

4.2.1.2. Muestras de hígado

Un total de 75 bandas fueron seleccionadas bien por su presencia-ausencia o por su intensidad diferencial. Tras ser reamplificadas, 56 bandas fueron secuenciadas y analizadas haciendo uso de las principales bases de datos públicas. Un total de 24 fragmentos no pudieron ser identificados en las bases de datos debido a que no se encontró homología significativa con la secuencia de los genes publicados y 18 fragmentos presentaron homología con un elevado número de secuencias. De igual manera que con las muestras de músculo algunas secuencias presentaron una elevada homología con un mismo gen debido a que los cebadores arbitrarios se unen a distintas regiones del gen. En la Tabla 4.3 se detalla el resultado de las catorce bandas restantes que fueron comparadas con las bases de datos públicas disponibles. En ella se indica el gen del que forman parte (cuando se conoce), su función, el número de acceso de GenBank con indicación de la especie en la que está descrito ese gen y el grupo experimental en el que aparece la banda diferencial.

Tabla 4.3. Resultados de anotación de las secuencias recortadas y reamplificadas para su identificación en muestras de hígado de *O. niloticus*. La denominación del fragmento se basa en la combinación de cebadores del cual se obtuvo el fragmento y el tamaño del fragmento del gel del cual fue recuperado.

Banda	Gen	Función	Nº acceso GenBank	Especie	Grupo experimental
C12-456 C12-508	ZP3 (LOC100699900)	Regula la interacción Ovulo-Espermatozoide	XM_003440380.2	<i>O.niloticus</i>	Aceite de Girasol
C12-349 C12-312 C12-353 C12-156	TAPBP1	Proteína hipotética	XM_003450641.3	<i>O.niloticus</i>	Aceite de Girasol
G9-270 G9-277	Genoma mitocondrial	Transcripción de genes mitocondriales	HM067614.1	<i>Oreochromis sp.</i>	Aceite de Girasol
G9-155 G9-314 G9-163 G9-361	Genoma mitocondrial	Transcripción de genes mitocondriales	GU477631.1	<i>Oreochromis sp.</i>	Aceite de Lino
G9-243 G9-297	Genoma mitocondrial	Transcripción de genes mitocondriales	GU477631.1	<i>Oreochromis sp.</i>	Aceite de Pescado

4.2.2. Expresión diferencial en genes candidatos por qRT-PCR

4.2.2.1. Genes Candidatos Implicados en el Metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados.

Con el fin de evaluar la expresión diferencial de genes candidatos funcionales se empleó la técnica de PCR a tiempo real. Los genes candidatos se eligieron por su implicación en rutas metabólicas importantes del metabolismo de ácidos grasos, del estrés y de la acción hormonal en peces.

- **ACLY (ATP citrato liasa):** Es la primera enzima responsable de la síntesis del acetil-CoA. Cataliza la conversión de citrato a oxalacetato y acetil-CoA. La expresión del gen ACLY se encontró significativamente disminuida ($p < 0,05$) en tejido hepático en los peces alimentados con dietas de AcG y AcGAO (Figura 4.2 y 4.3) cuando se comparó con los alimentados con AP. Del mismo modo, en los peces alimentados con AcL se observó una ligera tendencia (aunque no significativa) de disminución de expresión ($p = 0,1$)
- **FAS (Sintasa de Ácidos grasos):** Es una enzima multifuncional que permite la síntesis del ácido palmítico (C16:0) a partir de acetil-CoA y malonil-CoA. Los análisis de expresión mostraron que la expresión del gen FAS está disminuida significativamente en tejido hepático ($p < 0,05$) en todos los peces alimentados con aceites vegetales cuando se comparó con los alimentados con AP (Tabla 4.4 y Figura 4.1, 4.2, 4.3).
- **ME (Enzima málica):** Enzima que interviene en el metabolismo de los ácidos grasos transformando el Malato en Piruvato. Los análisis de expresión mostraron que las diferentes dietas de aceites vegetales no afectaron significativamente a la expresión del gen ME (Tabla 4.4).

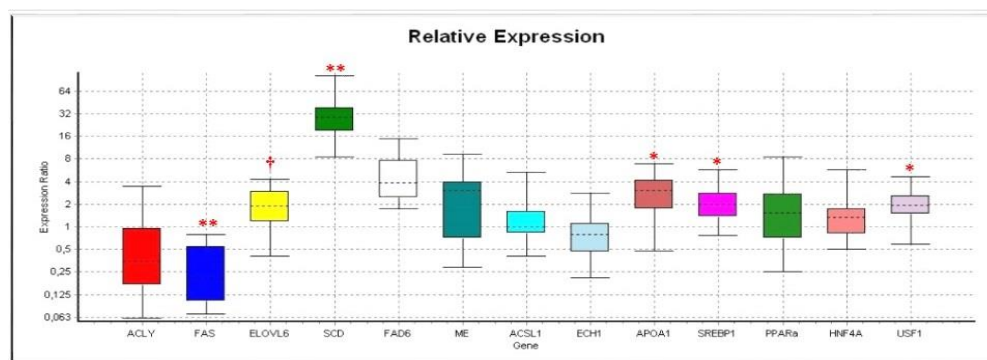


Figura 4.1. Efecto de la dieta de aceite de lino en la expresión génica de *O. niloticus* en tejido hepático. Los resultados se obtienen de comparar los peces alimentados con AL frente a los alimentados con AP. Las barras representan un 95% de I.C (intervalo de confianza) en cada grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas con un * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; † $p < 0,1$.

- **ELOVL6 (elongasa de ácidos grasos de cadena larga tipo 6)** Enzima que participa en la elongación de ácidos grasos saturados y monoinsaturados de 12, 14 y 16 carbonos.

Las dietas no afectaron significativamente la expresión del gen ELOVL6 (Tabla 4.4) aunque se observó un ligero incremento en la expresión (no significativo) ($p=0,099$) en el grupo de peces alimentados con aceite de lino. (Figura 4.1)

- **SCD (delta 9 estearil-CoA desaturasa):** Enzima encargada de introducir insaturaciones en la posición C9 para producir los ácidos grasos monoinsaturados palmitoleico (16:1) y oleico (18:1).

El análisis de expresión mostró un incremento significativo en la expresión del gen SCD ($p < 0,01$) en tejido hepático (Tabla 4.4) entre los distintos grupos alimentados con aceites vegetales cuando se compara con los alimentados con aceite de pescado (Figura 4.1, 4.2, 4.3)

- **FAD6 (delta-6 desaturasa):** Es una enzima que regula tanto la conversión ácido linoleico y linolénico en ácidos grasos poliinsaturados (AA, DPA, EPA, DHA).

El análisis mostró un incremento significativo en la expresión del gen FAD6 ($p < 0,05$) en tejido hepático (Tabla 4.4) entre los distintos grupos alimentados con aceites vegetales cuando se compara con los alimentados con aceite de pescado (Figura 4.1, 4.2, 4.3).

- **ACSL1 (Acil coA sintetasa para ácidos grasos de cadena larga):** Participa en el proceso de oxidación de los ácidos grasos. Se encuentra ubicada en la membrana mitocondrial externa, donde cataliza el paso previo de activación del ácido graso a Acil coenzima A (Acil-CoA).

Los análisis mostraron una disminución significativa en la expresión del gen ACSL1 ($p=0,008$) en peces alimentados con aceite de girasol (Tabla 4.4) cuando se compara con los alimentados con AP (Figura 4.2).

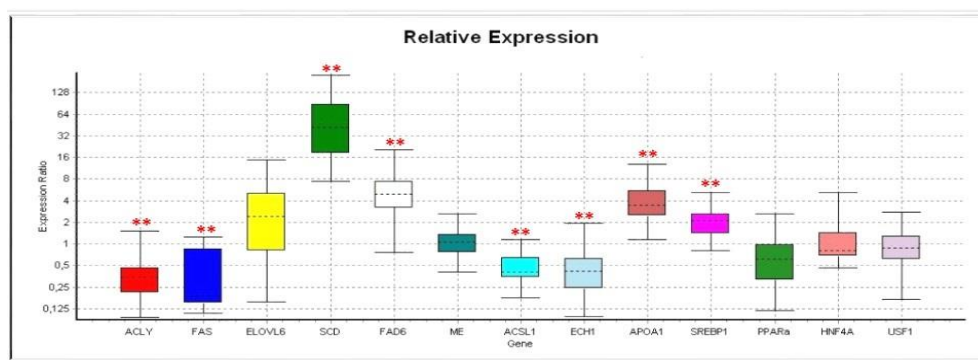


Figura 4.2. Efecto de la dieta de aceite de girasol en la expresión génica de *O. niloticus* en tejido hepático. Los resultados se obtienen de comparar los peces alimentados con AG frente a los alimentados con AP. Las barras representan un 95% de I.C (intervalo de confianza) en cada grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas con un * $p<0,05$; ** $p<0,01$

- **ECH1 (enoil-CoA hidratasa):** Es una de las enzimas que participa en el segundo paso de la oxidación de los ácidos grasos, realizando la hidratación del enlace entre los carbonos C-2 y C-3.

Los análisis mostraron que la expresión del gen ECH1 se encuentra significativamente disminuido en tejido hepático ($p<0,05$) (Tabla 4.4) en los peces alimentados con dietas de AcG y AcGAO (Figura 4.2 y 4.3) cuando se compara con los alimentados con AP.

- **APOA1 (apolipoproteína A-I):** Es una proteína de gran peso molecular. Sintetizada en el hígado y en el intestino, es el principal componente de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y responsable de la eliminación del colesterol de las células.

El gen APOA1 presentó una expresión incrementada ($P < 0,05$), en tejido hepático, en los peces alimentados con dietas de AcL y AcG (Figura 4.1 y 4.2) cuando se comparó con los alimentados con AP (Tabla 4.4). Del mismo modo, en los peces alimentados con AcGAO se observó una ligera tendencia (aunque no significativa) de incremento de expresión ($p = 0,073$) (Figura 4.3).

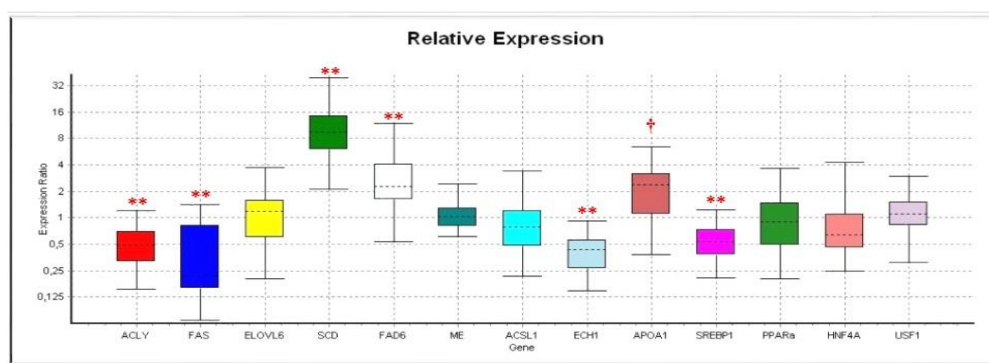


Figura 4.3. Efecto de la dieta de aceite de girasol alto oleico en la expresión génica de *O. niloticus* en tejido hepático. Los resultados se obtienen de comparar los peces alimentados AcGAO frente a los alimentados con AcP. Las barras representan un 95% de I.C (intervalo de confianza) en cada grupo. Los asteriscos indican diferencias significativas con un * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; † $p < 0,1$.

- SREBP-1 (Proteína de Unión al Elemento de Respuesta a Esteroles):** Es una de las tres proteínas producidas por el factor de transcripción SREBP (SREBP1a, SREBP1c y SREBP2). Participa directamente en la expresión y regulación de genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos. Su expresión se halla regulada por factores hormonales y la dieta (Ou y col., 2001). Los resultados del análisis de expresión en tejido hepático, mostraron que en los peces alimentados con AcL y AcG el gen SREBP1a aumentó significativamente ($p < 0,05$) su expresión (Figura 4,1 y 4.2), mientras que los alimentados con AcGAO se observó una ligera disminución en la expresión ($p = 0,009$) (Figura 4.3 y Tabla 4.4).

- **PPAR α (Receptor activado proliferador de peroxisoma):** Es uno de los 3 miembros (PPAR α , PPAR β y PPAR γ) de la familia de factores de transcripción PPAR. Su principal función es la oxidación de ácidos grasos particularmente en el ayuno, activando los genes que participan en el catabolismo de los lípidos.
No se encontraron diferencias significativas de expresión en el gen entre los peces alimentados con aceites vegetales cuando fueron comparados con los alimentados con aceite de pescado (Tabla 4.4)
- **HNF-4 (Factor nuclear hepático-4):** Es un factor nuclear del hepatocito y controla directa o indirectamente diversos genes hepáticos, entre ellos los genes que codifican apolipoproteínas, enzimas involucradas en el metabolismo del hierro y carbohidratos. Se expresa considerablemente en el hígado, riñón, intestino y páncreas y presenta gran afinidad a los ácidos grasos de cadena larga.
Los análisis de expresión no mostraron diferencias significativas entre los peces alimentados con dietas de aceites vegetales, no afectando de esta manera a la expresión del gen HNF-4 (Tabla 4.4).
- **USF1 (upstream stimulatory factor 1)** Gen que se encuentra relacionado con factores de riesgo cardiovascular.
Los análisis de expresión mostraron un aumento en la expresión del gen USF1 ($p=0,026$) en los peces alimentados con aceite de girasol cuando se comparó con los alimentados con aceite de pescado (Tabla 4.4, Figura 4.2).

Tabla 4.4. Expresión relativa por RT-qPCR en tejido hepático de *O. niloticus* (tilapia) en peces alimentados con aceites vegetales frente a los alimentados con aceite de pescado. Los valores de la expresión fueron normalizados con gen *EEF1*.

	Aceite de Lino		Aceite de Girasol		Aceite de Girasol Alto Oleico	
	Expresión	p-value	Expresión	p-value	Expresión	p-value
ACLY	-0,405	0,1	-0,328	0,01	-0,458	0,01
FAS	-0,225	0,003	-0,297	0,033	-0,295	0,026
ME	n.s		n.s		n.s	
ELOVL6	+1,763	0,099	n.s		n.s	
SCD	+27,715	0,001	+42,386	0	+9,044	0
FAD6	+4,318	0	+4,87	0,003	+2,533	0,027
ACSL1	n.s		-0,446	0,008	n.s	
ECH1	n.s		-0,418	0,042	-0,389	0,001
APOA1	+2,546	0,018	+3,667	0,001	+1,904	0,073
SREBP1	+2,022	0,018	+2,026	0,007	-0,519	0,009
PPARα	n.s		n.s		n.s	
HNF4	n.s		n.s		n.s	
USF1	+1,826	0,026	n.s		n.s	

Los resultados son obtenidos del análisis entre cada dieta vegetal frente a la dieta basado en aceite de pescado. Las diferencias estadísticas en la expresión genética fueron evaluadas en utilizando el programa REST© (Pfaffl y col., 2002). Los valores son considerados significativamente diferentes cuando $p < 0,05$. Los genes que presentan expresión aumentada se muestran con (+) y los que presentan expresión disminuida con (-); los genes que no mostraron diferencia de expresión se presentan con (ns).

4.2.2.2. Genes Relacionados con el estrés.

- **KRL (killer cell-like receptor):** Las células natural killer pertenecen al sistema inmune y participan en múltiples respuestas defensivas fisiológicas.

Los análisis de expresión mostraron que la expresión del gen KRL está disminuida significativamente en tejido hepático ($p < 0,05$) en los peces alimentados con aceite de lino y aceite de girasol (Figura 4.4 y 4.5) cuando se comparó con los alimentados con aceite de pescado. En los peces alimentados con aceite de girasol alto oleico la ligera disminución de la expresión del gen no resultó significativa ($p = 0,11$) (Tabla 4.5).

- **HSP70 (proteína de choque térmico 70 KDa):** Son proteínas de choque térmico, implicadas en el plegamiento de proteínas, protegiendo a las células de los efectos tóxicos del calor y otras formas de estrés.

Los análisis de expresión mostraron que la expresión del gen HSP70 se encuentra disminuida ($P < 0,05$) en tejido hepático en los peces alimentados con dietas de AcL y AcG cuando se comparó con los alimentados con AcP (Figura 4.4 y 4.5). Del mismo modo, en peces alimentados con AcGAO se observó también una ligera disminución (aunque no significativa) en la expresión ($p = 0,082$) (Tabla 4.5).

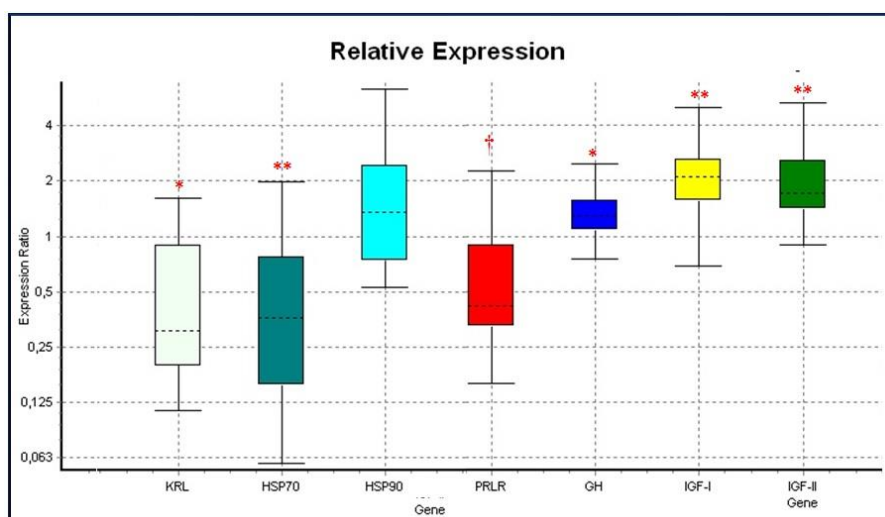


Figura 4.4. Expresión génica por RT-PCR en tejido hepático de *O. niloticus* por efecto de la dieta de aceite de Lino. Los resultados se obtienen de comparar los peces alimentados con aceites Lino frente a los alimentados con ácidos aceite de pescado. Las barras representan un 95% de I.C (intervalo de confianza) en cada grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, $p < 0,1$

- **HSP90 (proteína de choque térmico 90 KDa):** Es una proteína denominada chaperona que interviene en la estabilización de proteínas en situaciones de hipertemia.

Los análisis de expresión no mostraron diferencias significativas entre los peces alimentados con aceites vegetales comparados con los alimentados con aceite de pescado (Tabla 4.5).

- **PRL (Prolactina):** Es una hormona promotora de la adaptación a los ambientes hipo-osmóticos en peces y participa en la estimulación del sistema inmunitario. Los análisis mostraron que la expresión del gen del receptor de la PRL se encuentra significativamente disminuida ($P < 0,05$) en tejido hepático en peces alimentados con dietas de AcG y AcGAO (Figura 4.5 y 4.6) cuando se comparó a los alimentados con AcP. Del mismo modo, una ligera disminución en la expresión del gen (aunque no significativa) se evidenció en peces alimentados con AL ($p = 0,065$) (Tabla 4.5).

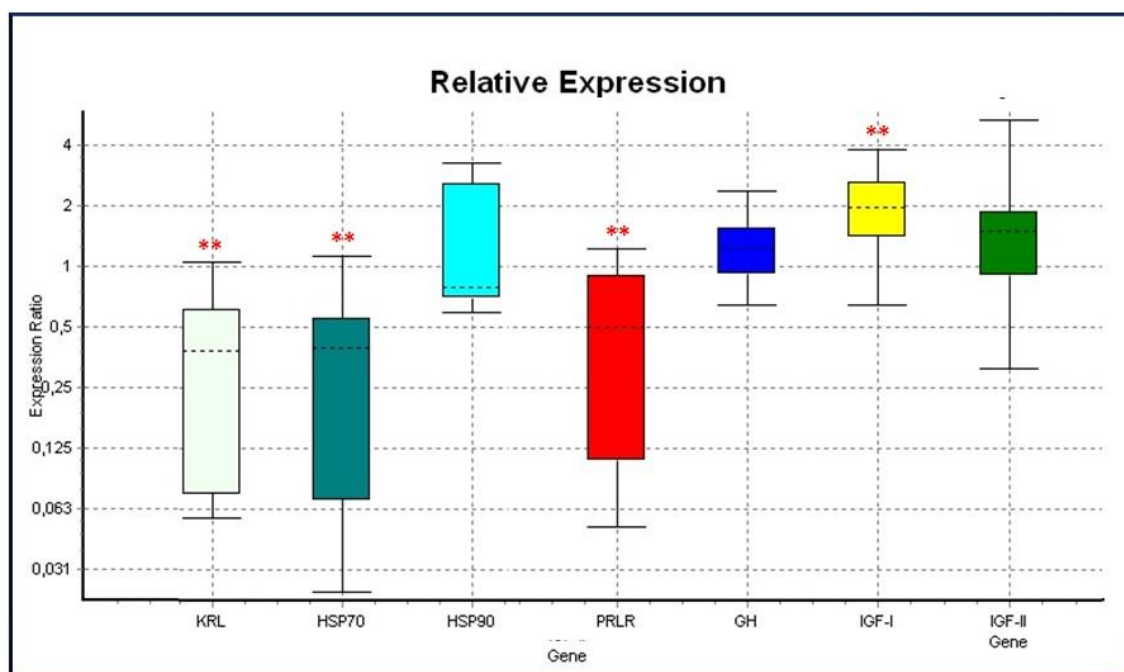


Figura 4.5. Expresión génica por RT-PCR en tejido hepático de *O. niloticus* por efecto de la dieta de aceite de Girasol. Los resultados se obtienen de comparar los peces alimentados con aceites Lino frente a los alimentados con ácidos aceite de pescado. Las barras representan un 95% de I.C (intervalo de confianza) en cada grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0.01$

- **GH (hormona de crecimiento):** Hormona que participa en el crecimiento corporal y osmoregulación en peces. Es considerada también como hormona anti estrés.

Los análisis mostraron un incremento significativo en la expresión del gen GH ($p < 0,05$) en tejido hepático en peces alimentados con dieta de AcL cuando se comparó con los alimentados con AcP (Figura 4.4). En el grupo de peces alimentados con AcGAO también se observó un ligero incremento (aunque no significativa) de la expresión ($p = 0,092$) (Tabla 4.5).

- **IGF-I (factor de crecimiento insulínico tipo I):** Hormona que participa principalmente en el crecimiento óseo y su estimulación es dependiente de la hormona GH. Su expresión se ve influenciada por niveles de estrés, estado de salud y niveles de nutrición, entre otros.

El análisis mostró un incremento significativo en la expresión del gen IGF-I ($p < 0,05$) en tejido hepático (Tabla 4.5) entre los distintos grupos alimentados con aceites vegetales cuando se comparó con los alimentados con AcP (Figura 4.4, 4.5, 4.6).

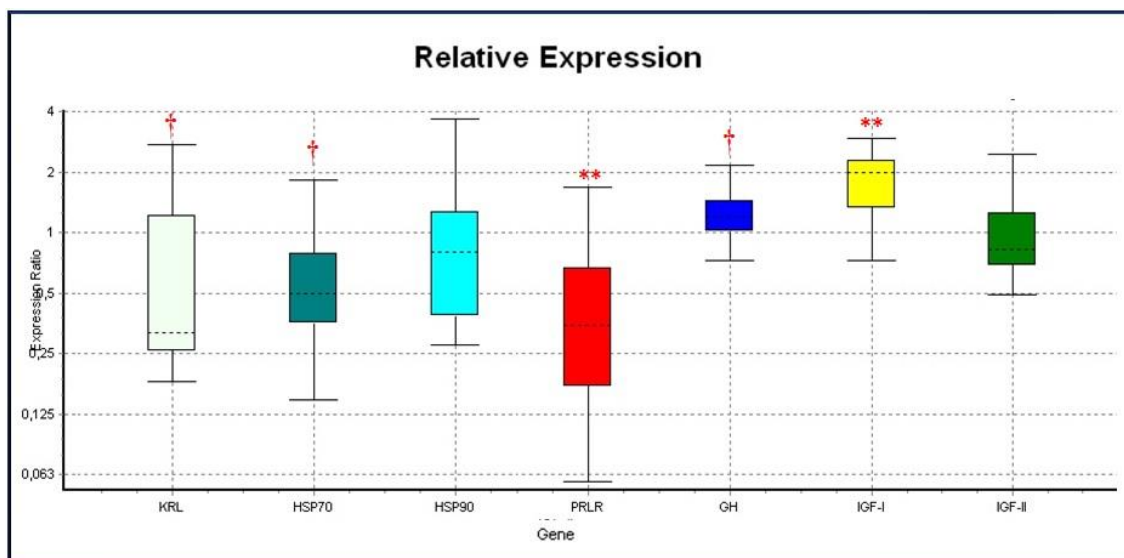


Figura 4.6. Expresión génica por RT-PCR en tejido hepático de *O. niloticus* por efecto de la dieta de aceite de Girasol alto oleico. Los resultados se obtienen de comparar los peces alimentados con aceites Girasol alto Oleico frente a los alimentados con ácidos aceite de pescado. Las barras representan un 95% de I.C (intervalo de confianza) en cada grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ † $p < 0,1$

- **IGF-II (factor de crecimiento insulínico tipo II):** Hormona que participa en el crecimiento celular temprano. Es estimulada por la hormona GH y los niveles de expresión están influenciados por diversos factores, entre ellos el estrés y el estado nutricional.

Los análisis mostraron un incremento en la expresión del gen IGF-II ($p=0,012$) en peces alimentados con AcL cuando se compara con los alimentados con AcP (Tabla 4.5, Figura 4.4).

Tabla 4.5. Expresión relativa por RT-qPCR en tejido hepático de *O. niloticus* de genes relacionados con el estrés.

	Aceite de Lino		Aceite de Girasol		Aceite de Girasol Alto Oleico	
	Expresión	p-value	Expresión	p-value	Expresión	p-value
PRLR	-0,502	0,065	-0,353	0,044	-0,339	0,036
GH	+1,324	0,047	n.s		+1,01	0,092
IGF-I	+2,009	0,014	+1,845	0,02	+1,727	0,018
IGF-II	+1,874	0,012	n.s		n.s	
KRL	-0,383	0,05	-0,266	0,004	-0,5	0,11
HSP70	-0,345	0,045	-0,242	0,009	-0,55	0,082
HSP90	n.s		n.s		n.s	

Los valores de la expresión fueron normalizados con gen *EEF1*. Los resultados son obtenidos del análisis entre cada dieta conteniendo aceites vegetales frente a la dieta basado en aceite de pescado. Las diferencias estadísticas en la expresión genética fueron evaluadas en utilizando el programa REST© (Pfaffl y col., 2002). Los valores son considerados significativamente diferentes cuando $p < 0,05$. Los genes que presentan expresión aumentada se muestran con (+) y los que presentan expresión disminuida con (-); los genes que no mostraron diferencia de expresión se presentan con (ns).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En este estudio, hemos tratado de realizar un enfoque de los aspectos de la nutrigenómica de la tilapia respecto a la respuesta génica en el metabolismo de los ácidos grasos, sistema inmune y osmoregulación generada como consecuencia del reemplazo total del aceite de pescado por aceites vegetales en la dieta y la frecuencia de alimentación en la Tilapia del Nilo (*O. niloticus*).

5.1. Experimento 1: Influencia de la Frecuencia de Alimentación en la Expresión Génica.

5.1.1. Expresión diferencial en muestras de cerebro

A pesar de los esfuerzos realizados en el desarrollo de genotecas de tilapias en diferentes tejidos (esta información está incluida en el Cyclid genome consortium (<http://cichlid.umd.edu/CGCindex.html#maps>)), como gónada (Nagahama, 18186 ESTs), cerebro y gónadas (Baroiller/D'Cotta), cerebro y branquias (Genomar, 2500 ESTs) y cerebro, corazón y músculo (Martins), el genoma de la especie *O. niloticus* no se conoce aún en su totalidad. En el año 2010, Lee y col., publicaron el primer mapa genético en tilapia que incluía secuencias BAC y ESTs y Guyon, y col., (2012), utilizando paneles de híbridos radiados (Radiation Hybrid –RH), genotipó 850 genes, 82 marcadores BAC, 154 microsatélites y 272 polimorfismos de nucleótido único (SNPs).

La técnica de *Differential Display* no precisa de ningún conocimiento previo sobre el genoma de estudio, requiere baja cantidad de ARN de partida, es simple a nivel metodológico y ha mostrado su utilidad en estudios de expresión diferencial, motivos por los cuales fue seleccionado para el desarrollo del presente trabajo.

En los resultados obtenidos cabe resaltar que se identificaron patrones transcripcionales diferenciales entre los pools correspondientes a muestras de individuos que fueron alimentados ad libitum y una vez al día y por tanto asociados al estrés producido por la frecuencia de alimentación. Esta asociación se ha observado en salmón (*Salmo salar*) o en rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) por efecto de la privación de alimento (Soengas y col., 1996; Figueroa y col., 2000; Polakof y col., 2007).

Hemos reamplificado y secuenciado diez de las bandas que corresponden a transcritos que generan diferentes proteínas, y la técnica utilizada ha mostrado ser una buena opción para identificar genes que se expresan bajo determinadas condiciones de estrés, en una especie cuyo genoma es todavía poco conocido, con la ayuda de la información generada en otras especies.

Las secuencias de las bandas seleccionadas por expresión diferencial mostraron homología con genes desconocidos, con genes de *O. niloticus*, *Maylandia zebra*, clones de *Danio rerio* o de *Homo sapiens* de gran longitud y que contienen varios genes completos o parciales y con secuencias codificantes desconocidas que por anotación automática se asocian a un hipotético gen que dará lugar a un producto actualmente desconocido. Estas secuencias requieren un trabajo adicional para determinar su función mediante análisis de similitud de dominios y comparación con otras especies cuyo proyecto genoma está más desarrollado, como, por ejemplo, la especie humana.

Las bandas G3-250, G8-170 y A9-300 presentaron homología con bases de datos de la especie *Homo sapiens*. Tal es el caso, de genes que intervienen en los mecanismos de intercambio de Ca^{2+} y Cl^- , como son el N-type calcium channel alpha-1 subunit CCHL1A2 o el CLIC6, también llamado Chloride channel 6, que interacciona con receptores de Dopamina (Friedli y col., 2003) o el gen ALOX5, que interviene en la producción de leucotrienos, conocidos mediadores en los procesos inflamatorios.

Entre las secuencias identificadas dentro de la propia especie de estudio *O. niloticus* y en el grupo alimentado ad libitum frente a los sometidos a estrés, se ha encontrado que la banda G8-174 presenta homología con el gen EPD1 (Ependymin-1 precursor putative) una glicoproteína que se encuentra en altas concentraciones en el líquido cefaloraquídeo de los peces teleósteos y que fue originalmente asociado con el proceso de aprendizaje en los peces (Shashoua, 1991). Este gen, ha sido caracterizado molecularmente y sus secuencias comparadas entre peces euteleosteos (Orti y Meyer, 1996). En las especies *Carassius auratus* y *Salmo salar* se ha estudiado su biosíntesis y se ha caracterizado la estructura del gen y de un precursor (Königstorfer y col., 1989(a), (b)., Müller-Schmid y col., 1992). Se conoce que esta proteína se expresa en diferentes tejidos en mamíferos (Apostolopoulos y col., 2001), mientras que en peces solo son

descritas en el cerebro (Shashoua, 1977). Los trabajos indican que en peces podría tener una función durante la regeneración axonal y estar asociado con la neuroplasticidad y regeneración del nervio óptico (Shashoua, 1991), mientras que en mamíferos (especialmente en humanos) se expresan en una variedad de tejidos y se ha demostrado están sobre expresado en el cáncer de colon (Nimmrich y col., 2001) y en el momento anterior al inicio de la proliferación y diferenciación de las células madres en tejido hematopoyético (Apostolopoulos y col., 2001).

De igual manera, se encontró homología de la banda G8-310 con el gen PLXNA4 cuya función ha sido estudiada en *Mus musculus* y *Rattus sp.*, describiéndola como un receptor de membrana que se une a la neurofibrina 1 y 2 (NRP: proteínas transmembrana) (Vieira y col., 2007) y traduce señales desde las semaforinas (sema3a - y sema6a – moléculas implicadas en el guiado neuronal) (Suto y col., 2005; Matsuoka y col., 2011). El complejo Nrp-Plexin-Semaforinas genera cascadas que regulan diversos procesos en el desarrollo del sistema nervioso (Gutekunst y col., 2012).

Entre otros genes encontrados que presentaron homología parcial con la banda G3-250 mencionaremos a un miembro de un grupo de moléculas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y que se expresan exclusivamente en el cerebro, el gen Contactin-3 (CNTN3). Aunque se desconoce su función en peces, los estudios en ratón y ratas muestran que su expresión se produce en las células Purkinje (o neuronas de Purkinje) localizadas en la corteza del cerebelo (Shimoda y Watanabe, 2009).

Del total de bandas analizadas, un único caso nos ha remitido al genoma mitocondrial completo de la especie *Oreochromis niloticus*, es el caso de la banda A9-250 que se corresponde con un fragmento de la subunidad 16s ribosómico mitocondrial descrito por He y col., (2011).

5.2. Experimento 2: Influencia de los Ácidos Grasos Poliinsaturados en la Expresión Génica

5.2.1. Expresión diferencial en muestras de Músculo

Del total de bandas diferencialmente expresadas en músculo, logramos identificar la secuencia de 7 de ellas que fueron expresadas en individuos alimentados con aceite de lino (AcL), aceite de girasol (AcG) y aceite de pescado (AcP). En la mayoría de los casos, la secuencia de la banda correspondió a genes que codifican proteínas hipotéticas en la especie *O. niloticus* y en otros casos a transcritos no identificados.

En el grupo alimentado con aceite de lino, encontramos 4 bandas diferencialmente expresadas: C3-395, C3-267, G2-200, C3-188. Una de las bandas, C3-188, banda codifica una proteína de función desconocida,

En el grupo alimentado con AL, encontramos las bandas C3-395 y C3-267 que se corresponden con diferentes zonas del gen Laminin alpha 3 (LAMA3) que codifica una proteína hipotética en *O. niloticus*. Los estudios de la función de este gen en *Homo sapiens* y *Bos taurus* indican que codifican un grupo de proteínas que regulan el crecimiento celular, la motilidad y la adhesión celular. Se les relaciona también con la formación y organización de las membranas basales, que dan fuerza y elasticidad a la piel (Bruckner-Tuderman y Has, 2014; Sartelet y col., 2015). Se conoce que el ácido linolénico tiene aplicaciones en medicina por sus efectos beneficiosos, entre otros, sobre el hígado y eczemas en la piel (Asadi-Samani y col., 2014).

En el mismo grupo, identificamos también a las bandas C3-188 y G2-200. En el primer caso, la banda codifica una proteína de función desconocida, pero en el caso del transcrito correspondiente a la banda C2-200, pudimos identificar homología con el gen STRIP (Striatin Interacting Protein 1). Los estudios mencionan que podría estar implicado en la organización del citoesqueleto, la morfología celular y la migración. (Bai y col., 2011)

En el caso de las tilapias alimentadas con AcG, el transcrito correspondiente a la banda A8-221 mostró homología con el gen GABARAPL1 (gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1), una proteína asociada al receptor GABA,

multivalente, evolutivamente conservada, y relacionada con la inmunidad innata en células eucarióticas. Los estudios realizados en moluscos muestran que el nivel de expresión aumentó en el hepatopáncreas luego de un desafío bacteriano (Bai y col., 2012). Estos resultados sugieren, que en peces, es posible que el receptor GABARAP pueda desempeñar funciones en el sistema inmune innato contra los patógenos.

Se observó también, en el grupo de tilapias alimentadas con AcP una banda diferencialmente expresada identificada como C2-370 que mostró homología con el gen GAPDH. El GAPDH es una proteína multifuncional, que cataliza la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato, un intermediario en el catabolismo de la glucosa. Ahora se sabe que esta proteína (GAPDH) interviene en procesos tan diversos como la duplicación y la reparación del DNA, la endocitosis y los eventos de la fusión de membranas en mamíferos (McKee y McKee, 2014). Los estudios revelan que GAPDH presenta dos isoformas, relacionadas con la modulación inmune y cuya respuesta transcripcional fue modulada en respuesta a la actividad viral y bacteriana (Cho y col., 2008; Seo y col., 2014).

5.2.2. Expresión diferencial en muestras de Hígado

Las secuencias de las bandas diferencialmente expresadas en hígado, de individuos alimentados con aceite de lino (AcL), aceite de girasol (AcG) aceite de girasol alto oleico (AcGAO) y aceite de pescado (AcP), mostraron homología con glicoproteínas y genes del genoma mitocondrial de tilapia.

En el grupo de tilapias alimentadas con AcG se identificaron 8 bandas diferencialmente expresadas cuando fueron comparadas con los grupos alimentados con AcL, AcGAO y AcP, sin embargo, debido a que varios fragmentos presentaron homología con una misma secuencia (como se mencionó en los Resultados, en el punto 4.5.1.2) solo fueron 3 las secuencias identificadas: ZP3, TAPBP1 y parte del genoma mitocondrial completo de la especie *Oreochromis sp.*

ZP3 [Glicoproteína 3 de la Zona Pelúcida - Zona Pellucida Glycoprotein 3 (Sperm Receptor)], fue identificada con alta homología a partir de las bandas C12-456 y C12-508. ZP3, actúa como ligando de la zona pelúcida (Del Rio y col., 2007) y sus funciones

se desarrollan durante la fertilización y el desarrollo pre-implantacional. Los estudios han demostrado que los sitios de expresión de estas proteínas difieren de una especie a otra. En rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) y en *Pimephales promelas* se ha descrito expresión hepática (Hyllner y col., 2001; Kapler y col., 2011), en *Danio rerio* y *Ciprinus carpio* se encontró solamente expresión ovárica (Wang y Gong, 1999; Mold y col., 2001), mientras que en medaka (*Oryzias latipes*) la expresión fue reportada tanto en hígado como ovarios (Hyllner y col., 2001). En este sentido, Berois y col., (2011) considera que la regulación de esta glicoproteína es compleja y que diferirá entre una especie y otra dependiendo de su lugar de expresión. Tal es así, que la regulación a través de los estrógenos puede ser modulada en el hígado y no en ovarios.

Por otro lado, el gen TAPBP1, codifica una glicoproteína transmembrana que media la interacción entre las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y el transportador asociado con el procesamiento de antígenos (TAP) que se requiere para el transporte de péptidos antigénicos a través de la membrana del retículo endoplásmico (Bangia y Cresswell, 2005).

Landis y col., (2005) sugirió que, dada la función que desarrolla el gen TAPBP y visto que en situaciones de infecciones virales se incrementa su expresión, en mamíferos, es posible que en peces su función sea la misma. Los trabajos realizados en *Dicentrarchus labrax* respecto a la caracterización genética de esta glicoproteína demostraron que se encuentra conservada a través de la evolución, lo que apoyaría la hipótesis que en peces la función sería semejante a la de mamíferos (Pinto y col., 2012).

5.2.3. Expresión diferencial detectada por qRT-PCR.

5.2.3.1. Genes Implicados en el Metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados

El consumo de peces provenientes de la acuicultura ha experimentado un alto desarrollo y crecimiento en los últimos años, incrementando con ello el consumo de pescado para la elaboración de los piensos. Es sabido, que el aceite de pescado es el principal componente de la dieta de los peces provenientes de la acuicultura por su alto contenido de aceites esenciales poliinsaturados de cadena larga ω -3. Esta situación, plantea la necesidad de buscar nuevas fuentes de ácidos grasos PUFA para

complementar o sustituir el aceite de pescado de la dieta sin generar a su vez efectos negativos que puedan afectar la industria de la pesca y la acuicultura.

Las investigaciones en nutrición y acuicultura de los últimos años, han centrado su atención en las dietas con fuentes de ácidos grasos PUFA (ω -3 y ω -6) provenientes de vegetales como la linaza (*Linum usitatissimum*), colza o canola (*Brassica napus*), soja (*Glycine max*), olivo (*Olea europea*), palma (*Elaeis guineensis*), girasol (*Helianthus annuus*), maíz (*Zea mays*) y sésamo (*Sesamum indicum*), así como los efectos que puedan tener sobre el bienestar de los peces y en su producción final (Izquierdo y col., 2003; Menoyo y col., 2004; Wassef y col., 2012, 2014). Los aceites vegetales más comunes estudiados vienen siendo el aceite de soja (SBO), aceite de lino (LO), aceite de colza (RO) y entre los menos estudiados tenemos al aceite de palma (PO), de oliva (OO) y el aceite de girasol (SFO) (Torestensen y col., 2000, Menoyo y col., 2007; Wassef y col., 2015).

En los resultados obtenidos al reemplazar el aceite de pescado de la dieta por aceites vegetales (aceite de lino, girasol y girasol-alto oleico) se ha observado cambios en la expresión de genes que participan en el metabolismo de los ácidos grasos, en procesos hormonales y en indicadores de estrés. Estos resultados son coherentes con lo observado por diversos autores, donde se demuestra que los ácidos grasos polinsaturados (ω -3 y ω -6), modifican, directa o indirectamente, la regulación de la expresión de genes que codifican enzimas fundamentales en diferentes vías metabólicas (Sessler y Ntambi, 1998; Montero y col., 2003; Mourente y col., 2005; Morais y col., 2011, 2012a, 2012b., Daimiel y col., 2012).

Es importante mencionar que la regulación génica por parte de los ácidos grasos se realiza a través de la interacción directa sobre receptores nucleares como el PPAR (Proliferator-Activated Receptor), RXR α (Retinoid X Receptor); LXR α (Liver X Receptor) y el HNF-4 (hepatic nuclear factor) y de manera indirecta a través de cascadas de señalización que van a actuar sobre factores de transcripción como el SREBP-1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein-1), ChREBP (Carbohydrate Regulatory Element Binding Protein) y MLX (Max-like factor X) (Pégorier y col. 2004; Jump 2008; Jump y col. 2008), que serán los encargados finales de controlar genes que participan en el

metabolismo de los ácidos grasos, colesterol y carbohidratos (Jump, 2004). Se ha demostrado también, que la interacción gen-nutriente afecta el metabolismo y la diferenciación celular así como en el crecimiento, desarrollo, salud y bienestar de los mamíferos (Jump y Clarke, 1999; Duplus y col., 2000; Clarke, 2001, Montero e Izquierdo, 2010).

Se conoce que dietas ricas en PUFA disminuyen la síntesis de ácidos grasos a través de la represión de SREBP-1 que inhibe la lipogénesis hepática. Entre las enzimas que participan en este proceso y que pueden ser moduladas encontramos a la Acetil CoA carboxilasa (ACC) (Salati y Clarke, 1986), Sintasa de ácidos grasos (FAS) (Clarke y col. 1990; Wang y col., 2010; Morais y col., 2011; Leng y col., 2012; Tian y col., 2015), ATP-citrato liasa (ACLY) (Chypre y col., 2012), enzima málica (ME), $\Delta 5$ -desaturasa (FAD5) (Cho y col., 1999a; Xue y col., 2015) y $\Delta 6$ -desaturasa (FAD6) (Cho y col., 1999b; Tian y col., 2015).

De la misma manera, los ácidos graso PUFA, reducen la concentración de triacilgliceroles en la sangre a través de la oxidación de los ácidos grasos por medio de la activación de PPAR α . Enzimas como lipoproteína-lipasa (LPL), Mitocondrial hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA), Sintasa acil-CoA deshidrogenasa (MCAD) y la Carnitina Palmitoiltransferasa- (CPT-1) que participan en los procesos de oxidación pueden ser moduladas por acción de PPAR α .

En nuestro estudio, encontramos que las dietas basadas en aceite de lino, girasol y girasol alto oleico (ricas en 18:3n-3, 18:2n-6 y C18:1n-9, respectivamente) modularon la expresión de los genes ACLY y FAS disminuyendo su expresión. Se conoce que ambos genes codifican enzimas fundamentales que participan en la formación del primer ácido graso saturado: el ácido palmítico C16:0.

En el caso de la expresión del gen FAS, concuerda con el estudio realizado en tilapias alimentadas con dietas suplementadas con aceite de soja y maíz, donde se observó disminución de la expresión de este gen en tejido hepático, muscular y adiposo (Tian y col., 2015).

Aunque la disminución de la expresión del gen FAS no fue demasiado baja (entre -0,2 y -0,3 veces), consideramos que la síntesis de ácidos grasos saturados en las

tilapias se vio afectada como respuesta a los aceites vegetales de la dieta, esta hipótesis se refuerza cuando encontramos la expresión del gen ACLY disminuida entre -0,3 y -0,5 veces. Como se sabe, la enzima ACLY es determinante en la formación del Acetil-CoA a partir del Citrato en el citosol. A su vez, la acetil-CoA carboxilasa (ACC), la primera enzima limitante de la lipogénesis de novo, convierte el acetil-CoA en malonil-CoA, que se transforma en ácido palmítico C16:0 por acción de la enzima sintasa de ácidos grasos (FAS) (Figura 5.1). El ácido palmítico puede ser elongado o desaturado para producir otros ácidos grasos de cadena larga (Chypre y col., 2012).

La menor expresión de las enzimas relacionadas con la síntesis de novo de ácidos grasos, ACLY y FAS, nos indican la disminución de la síntesis de ácidos grasos de cadena larga. Se conoce que dietas que contienen ácidos grasos del tipo PUFA regulan la expresión de los genes en el metabolismo de los lípidos a través del factor de transcripción SREBP-1 (Eberle y col., 2004; Jump 2008; Tanaka y col., 2010).

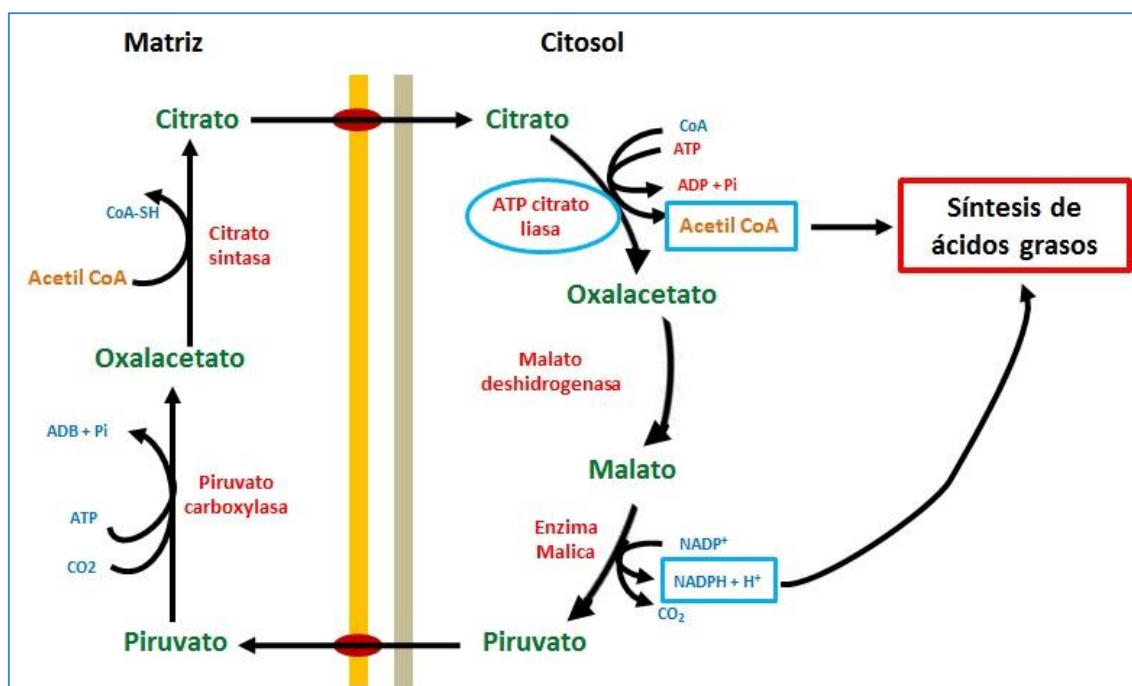


Fig.5.1. Participación de la enzima ATP citrato liasa y ácido graso sintasa en el metabolismo de los ácidos grasos.

Otro grupo de genes que encontramos afectados por el tipo de dieta administrada fueron la elongasa de ácidos grasos de cadena larga tipo 6 (ELOVL6), delta 9 estearil-CoA-desaturasa (SCD) y delta-6 desaturasa (FAD6). Estas enzimas se encargan de elongar y desaturar el ácido palmítico (Figura 5.2 y 5.3)

Las enzimas elongasas ELOVL son un familia de enzimas compuesta por 7 miembros, los cuales participan en el proceso de elongación de los ácidos grasos sintetizados en el citosol, se localizan en la membrana del retículo endoplasmático y se encargan de elongar los ácidos grasos SFA, MUFA y PUFA (Moon y col., 2001; Jakobsson y col., 2006; Monroig y col., 2010). Dentro de este grupo, el gen que sintetiza la enzima ELOVL6, participa en el primer paso de la elongación de los ácidos grasos, elongando los ácidos grasos saturados (SFA) y monoinsaturados (MUFA) de 12, 14 y 16 carbonos (Monroig y col., 2010).

Los resultados de expresión para el gen ELOVL6 mostraron un incremento de 1,8 veces más ($p=0,099$) en las tilapias alimentadas con aceite de lino (Acl) frente a las alimentadas con aceite de pescado, aunque no podemos afirmar que el ELOVL6 en nuestro trabajo esté contribuyendo en la elongación de los ácidos SFA ó MUFA porque su expresión no muestra significación estadística; es importante tenerla en cuenta ya que resultados similares se reportan en Atlantic Cod (*Gadus morhua*) alimentado con aceite de camelina, donde elovl6 se encontró 2.13 veces más expresada (aunque el valor no fue estadísticamente significativo) cuando se les comparó con los alimentados con aceite de pescado (Xue y col., 2014). Cabe indicar que el aceite de camelina es rico en ácidos grasos 18:n3 y 18:2n-6 al igual que el aceite de lino que está compuesto por un 53% de ALN-18n:3 y 16% de AL 18:2n-6.

La estearil-coA desaturasa (SCD) es la enzima más relevante que interviene en el paso limitante de la ruta de desaturación de ácidos grasos de cadena larga. Esta delta 9-desaturasa promueve la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) a partir de sustratos saturados. Específicamente, su actividad se asocia a una mayor producción de ácido oleico (C18:1n-9) y ácido palmitoleico (C16:1n-7) (Jeffcoat y col., 1977; Hsieh y col., 2003).

En tilapias alimentadas con dietas basadas en aceites vegetales, la expresión del gen SCD se encontró incrementada ($p < 0,001$) coincidiendo con los resultados reportados en carpas (*Ctenopharyngodon idellus*) alimentados con dietas basadas en aceite de soja y lino suplementadas con PUFA de cadena larga (Ji y col., 2011). Se conoce que la regulación del gen SCD está influenciada por la temperatura (Ma y col., 2015) y la dieta (Cheng y col., 2014). Se ha publicado que dietas elevadas de ácidos grasos saturados incrementan su expresión (Polley y col., 2003; Hsieh y col., 2007) contrariamente al efecto que producen los PUFA, que la disminuyen (Ntambi y Miyazaki, 2004).

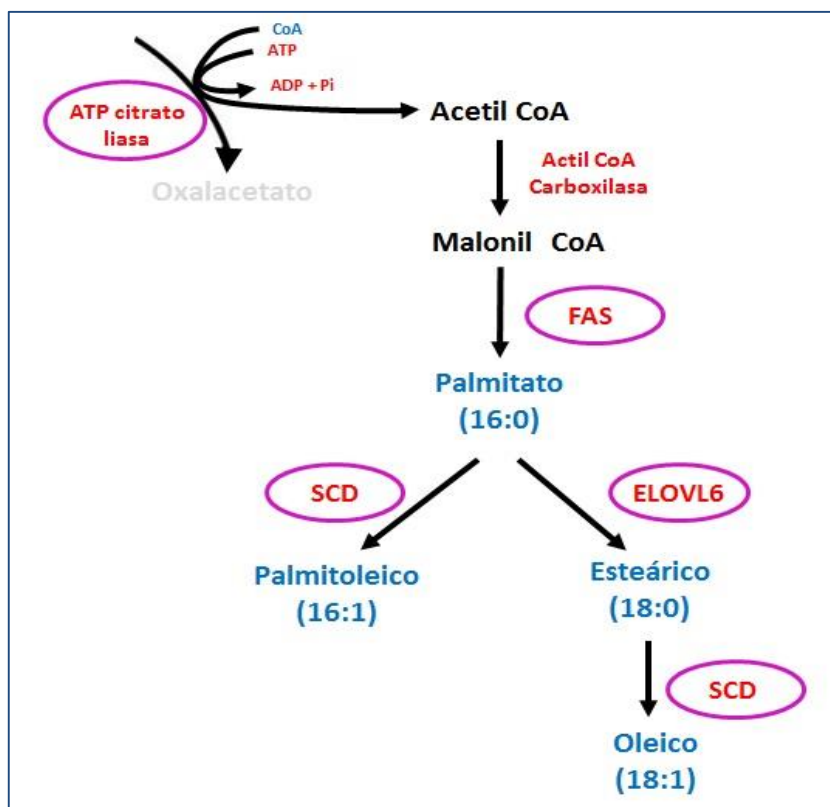


Figura 5.2. Esquema de las etapas de la formación de los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA). La expresión de las enzimas remarcadas con un círculo se encuentran reguladas por una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). FAS: Sintasa de ácidos grasos; SCD: delta-9-estearil-CoA desaturasa; ELOVL6: elongasa de ácidos grasos de cadena larga tipo 6.

Es interesante apuntar que este gen fue el único, entre los encontrados, que mostraron diferencia de expresión bastante alta según el tipo de aceite utilizado. Tal es así que, en el grupo de peces alimentados con aceite de girasol (AcGAO), aceite de lino (AcL) y aceite de girasol (AcGAO) la expresión fue 42,4, 27,7 y 9 veces mayor (respectivamente) frente a las tilapias alimentadas con aceite de pescado.

Nuestros resultados difieren con lo obtenido en estudios previos en carpa (*Cyprinus carpio*) donde la expresión se encontró disminuida en tejido hepático (Cheng y col., 2014) y en salmón (*Salmo salar*) (Jordal y col., 2005).

Así mismo, en los peces alimentados con dieta a base de aceites vegetales frente a los alimentados con aceite de pescado, se encontró niveles altos de expresión de la enzima delta-6 desaturasa (FAD6), sugiriendo la alteración en la ruta metabólica de la síntesis de lípidos en el hígado (Fig.5.3). El incremento de la enzima FAD6 (5,7 veces más expresada) podría explicarse por el reemplazo de la dieta a base de aceite de pescado, que contiene altas cantidades de ácidos grasos n-3 insaturados de cadena larga (EPA y DHA) que actúan como inhibidores del metabolismo de los lípidos (Ji y col., 2009). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en salmón (*Salmo salar*) alimentado con aceites vegetales (Zheng y col., 2005; Leaver y col., 2008; Morais y col., 2011), en rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Seilliez y col., 2001; Zheng y col., 2004; Panserat y col., 2009) en pez cebra (*Danio rerio*) (Jaya-Ram y col., 2008), en lubina (*Dicentrarchus labrax*) (González-Rovira y col., 2009) y pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Santerre y col., 2015).

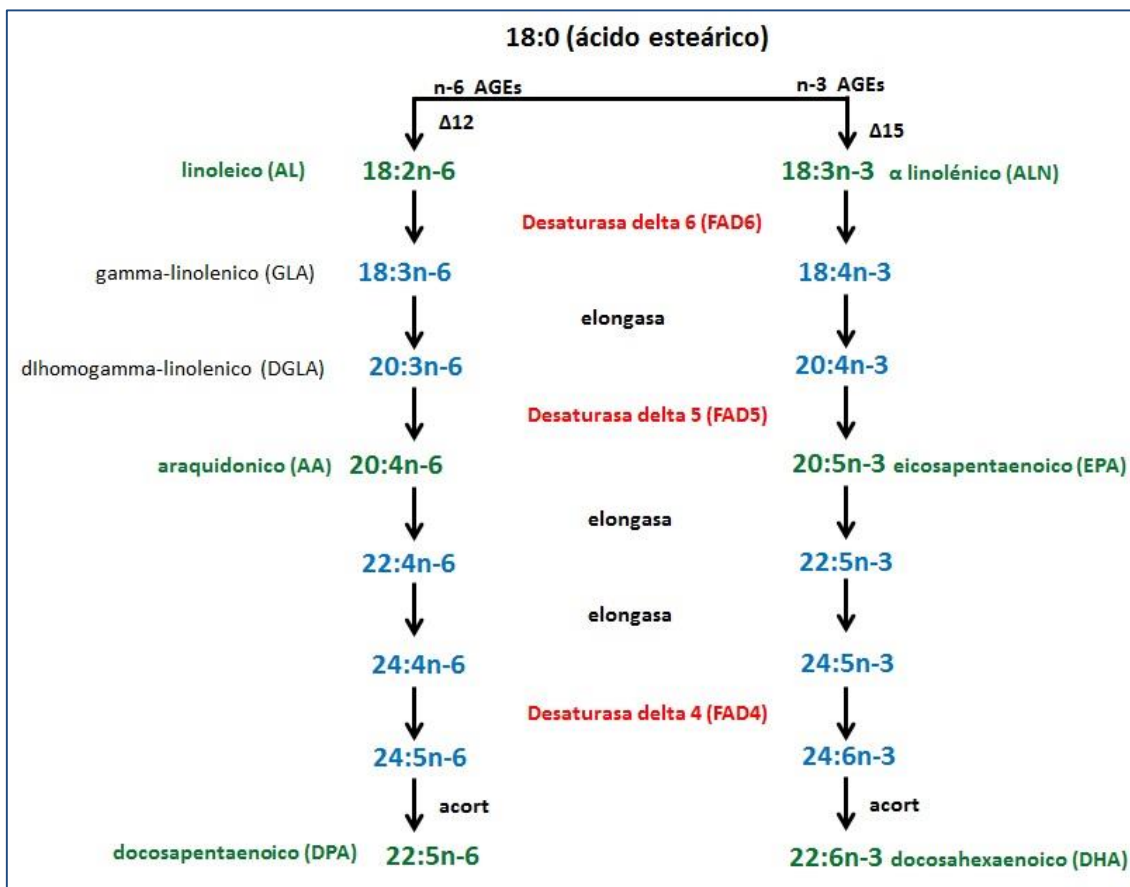


Figura 5.3. Esquema de la elongación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA).

Los factores de transcripción denominados Proteína de Unión al Elemento de Respuesta a Esteroles (SREBP) son proteínas que participan en la regulación del metabolismo del colesterol y ácidos grasos. Su expresión se halla regulada por factores hormonales y a la dieta. Se ha demostrado que los ácidos grasos PUFA (ω -3 y ω -6) y algunos de sus metabolitos, son capaces de regular su expresión porque antagonizan los efectos del receptor X hepático (LXR) (necesario para la transcripción eficiente del gen SREBP-1) al competir con el ligando endógeno de éste (los oxisteroles intermediarios en la biosíntesis del colesterol) (Ou y col., 2001). Los resultados mostraron que SREBP-1 se encontró incrementada significativamente (2 veces más) cuando la tilapia fue alimentada con aceite de lino (AcL) y aceite de girasol (AcG), sin embargo en los peces alimentados con aceite de girasol alto oleico (AcGAO) se encontró que su expresión estuvo disminuida (-0,5 veces) cuando se compararon con los peces alimentados con AcP.

El receptor nuclear PPAR α (receptor activado por proliferadores de peroxisomas α) es el regulador principal de la oxidación de los ácidos grasos. Su activación induce la expresión de genes involucrados en la β y ω oxidación. La expresión del gen PPAR α está regulada a estímulos como, el estrés, la liberación de insulina, la liberación de leptina en tejido adiposo y la acción de la hormona de crecimiento (GH). En el hígado la expresión del PPAR α se activa en respuesta a la inanición que permite el incremento en la expresión de los genes diana PPAR α lo que conduce a un aumento del catabolismo de los ácidos grasos. Los factores de transcripción que regulan la expresión del gen PPAR α incluyen al factor de hepatocitos nuclear 4 (HNF-4) que es un activador de la transcripción. Los resultados del estudio mostraron que la expresión del gen PPAR α y HNF-4 no fueron reguladas por las dietas suministradas a las tilapias.

No ocurre lo mismo en el caso de los genes Acil CoA Sintetasa para ácidos grasos de cadena larga (ACSL1) y Enoil-CoA hidratasa (ECH1) involucrados en el proceso de oxidación de los ácidos grasos, que en ambos casos fueron modulados. En el caso del gen ACSL1 su expresión se encontró disminuida significativamente solo en el grupo alimentado con aceite de girasol (AcG) y en el caso de ECH1 se encontró que tanto las dietas basadas en aceite de girasol (AcG) y girasol alto oleico (AcGAO) disminuyeron su expresión. Este resultado concuerda con lo reportado en salmón (*Salmo salar*) alimentado con aceite de colza (Jordal y col., 2005). Los estudios demostraron que dietas ricas en ácidos grasos de cadena larga (HUFA) como DHA (22:6n-3) y EPA (20:5n-3), incrementaron la actividad de las enzimas que participan en la oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria y los peroxisomas (Halminski y col., 1991; Jump y col., 1996; Ide y col., 2000).

Al igual que en los mamíferos, los peces movilizan los distintos lípidos a través de las lipoproteínas (VLDL, LDL y HDL). La lipoproteína HDL es la más abundante en el plasma y presenta dos apolipoproteínas, apoA-I y apoA-II (Choudhury y col., 2009). Se conoce que ApoA-I y II son transportadoras lípidos, pero además ApoA-I fue asociada con el sistema inmune innato y con su participación en el metabolismo lipídico. La expresión de ApoA-I en tilapias alimentadas con dietas de ácidos grasos vegetales se encontró incrementada frente a las alimentadas con aceite de pescado donde su

expresión se encontró disminuida. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en salmón (*Salmo salar*) alimentado con aceite de canola (Jordal y col., 2005).

El gen USF1 (upstream stimulatory factor 1) se encuentra implicado en la respuesta del organismo a la glucosa, a la ingesta de hidratos de carbono y a los ácidos grasos de la dieta. Entre los genes que es capaz de regular se incluyen los de varias apolipoproteínas, lipasa hormona-sensible, ácido graso sintasa, glucocinasa, receptor del glucagón y el factor de crecimiento IGF-II (Szentirmay y col., 2003). En tilapias alimentadas con AL, la expresión del gen USF1 se encontró incrementada 1,8 veces más que en las alimentadas con aceite de pescado.

5.1.1.1. Genes relacionados con el estrés.

La mayoría de estudios que compararon los efectos de dietas ricas y pobres en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) sobre la respuesta inmune, concluyen que las dietas ricas en PUFA disminuyen este tipo de respuesta, aunque su efecto dependerá de la naturaleza y cantidad de PUFA ingerido y de la especie en estudio.

El gen KRL (Killer cell-like receptor) codifica células conocidas como “células natural killer” (NK), las cuales pertenecen al sistema inmune y desarrollan una actividad similar a la de los linfocitos. Participan en la protección frente a virus, bacterias intracelulares o células tumorales (Kikuno y col., 2004; Dong y col., 2007) y pueden regular la respuesta inmune innata o adquirida (Kumar y Delovith, 2014). En las tilapias alimentadas con dietas de aceites vegetales (AcL, AcG y AcGAO), la expresión del gen KRL se encontró disminuida cuando se les comparó con el grupo alimentado con aceites de pescado. Esta respuesta de regulación podría deberse al tipo de ácido graso ingerido, indicando mejor adaptabilidad al medio y resistencia al estrés en las tilapias alimentadas con aceites vegetales.

Otros genes que mostraron ser modulados por el tipo de aceite en la dieta fueron los genes que codifican proteínas de choque térmico (HSP) como HSP70 y HSP90. Las HSP, son una familia de proteínas cuya expresión se encuentra relacionada a procesos de estrés. Los aumentos de temperatura, aclimatación a cambios de salinidad, agentes infecciosos, inflamaciones, contaminantes, competición, son situaciones que

aumentan la respuesta de éstas proteínas permitiendo la adaptación de las células a condiciones adversas, constituyéndose así en un mecanismo de defensa y protección de daño celular (Deane y col., 2002; Sorensen y col., 2003; Roberts y col., 2010; Tine y col., 2010). Entre los moduladores de los HSP, encontramos estudios en humanos que mencionan a ciertos ácidos grasos como el ácido araquidónico (AA) y docosahexaenoico (DHA) (Jurivich y col., 1994). En rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), se reporta que los PUFA (DHA y AA), mejoran la respuesta al estrés térmico al incrementar la expresión del HSP70 (Samples y col., 1999) y que la expresión del HSP90 fue incrementada en tejido hepático cuando fueron alimentadas con dietas que contenían harina de soja (Vilhelmson y col., 2004; Sealey y col., 2010). De igual manera, en salmón, la respuesta del HSP70 se vio incrementada cuando la dieta fue reemplazada con aceites vegetales (Morais y col., 2011). En nuestro trabajo, no encontramos efectos de modulación en la expresión del HSP90, lo que coincide con lo reportado por Montero y col. (2015) y contrariamente el HSP70 se encontró disminuido en los peces alimentados con aceites vegetales, al igual que lo obtenido por Benitez-Dorta y col. (2013) que reporta la reducción de la expresión de los HSP en diferentes tejidos de Senegalese sole (*Solea senegalensis*) alimentados con dietas basadas en aceites vegetales. Consideramos que en este estudio, el reemplazo total del aceite de pescado por dietas de aceites vegetales no generó situaciones de estrés debido al mejor aprovechamiento de los nutrientes que propició mejor calidad de agua y un mejor balance celular.

En peces, se ha demostrado con diversos estudios, la estrecha relación de los sistemas nervioso, endocrino e inmune a la hora de generar respuesta al estrés (Bateman y col., 1989; Barton y Iwama, 1991; Ruane y col., 1999). Las respuestas a los estímulos, se realizan gracias a ejes hormonales y a la actuación de neuropéptidos, hormonas, citoquinas y sustancias que actúan como mediadoras de la respuesta, con el fin de mantener la homeostasis (Ottaviani y Franceschi, 1998). Entre las hormonas que responden activamente bajo situaciones de estrés mencionaremos a la Prolactina (PRL), la hormona de crecimiento (GH) y los factores de crecimiento insulínico tipo I y II (IGF-I y IGF-II) que regulan el crecimiento corporal, metabolismo, reparación de tejidos y crecimiento, reparación y funcionamiento del sistema inmune (Bjornsson y col., 1994).

La participación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) como el AA, EPA, DHA y DHGLA se produce a través de su conversión a eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos). Se ha demostrado el papel de los eicosanoides como reguladores de procesos fisiológicos en peces, que incluyen procesos cardiovasculares (McKezie, 2001) ovulación y maduración de los ovocitos, función del sistema nervioso, osmorregulación y respuesta a procesos inflamatorios e inmunes (Mustafa y Srivastava, 1989; Rowley y col., 1985; Van Anholt y col., 2003, 2004).

En teleósteos eurihalinos como la tilapia, la hormona prolactina cumple un rol esencial en la adaptación a las aguas dulces a través de su participación en el equilibrio hidromineral (previene la pérdida o incremento de iones Na^+ , Cl^- y agua del organismo) y la osmorregulación (McCormick, 2001; Manzon, 2002; Sakamoto y McCormick, 2006; Seale y col., 2013). En rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), se encontró que la prolactina participa en la estimulación del sistema inmune específicamente sobre la actividad de las células fagocíticas (Yada y col., 1999; 2002) y en *O. mossambicus* los estudios mostraron que la prolactina está regulada por una variedad de procesos fisiológicos que incluyen el balance hidromineral, el crecimiento, el estrés, la respuesta inmune y la reproducción (Seale y col., 2013).

Otros estudios realizados en *O. mossambicus* revelan que el ácido araquidónico (AA) una vez convertido en prostaglandina actúa modulando hormonas como el cortisol y la prolactina en respuesta al proceso de osmoregulación (Van Anholt y col., 2004). El proceso comienza con la síntesis de la prostaglandina por acción de la enzima fosfolipasa A_2 que produce la hidrólisis del enlace fosfodiéster de los fosfolípidos de la membrana celular, liberando un ácido graso de 20 carbonos que será metabolizado por la vía de la ciclooxigenasa en prostanglandina y tromboxanos (Smith, 1989). En este trabajo, la prolactina (medida a través de su receptor) se encontró disminuida en los peces alimentados con aceites vegetales frente a los alimentados con aceite de pescado, en este sentido consideramos que los ácidos grasos PUFA no tuvieron ninguna influencia en su modulación. No ocurre lo mismo en los peces alimentados con aceites de pescado, en los que la expresión de la prolactina se encontró incrementada en 2.5 veces más, sugiriendo stress por osmoregulación probablemente debida a un desequilibrio

oxidativo. Esta situación es confirmada con los valores incrementados por encima del rango recomendado de iones cloruro (Cl^-) y sodio (Na^+) en el medio acuático (Túpac Yupanqui y col., 2011) y que concuerda con lo reportado en estudios de *O. mossambicus*, donde se encontró que la liberación de prolactina fue regulada por balance hidromineral (Seale y col., 2013).

De la misma manera, la expresión de la hormona de crecimiento (GH) y el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) se encontraron disminuidas en los peces alimentados con aceite de pescado cuando se comparó con los alimentados con dietas de aceites vegetales, lo que indicaría respuesta al estrés oxidativo, como se ha descrito en sea bream (*Sparus aurata*) (Saera-Vila y col., 2009).

Las hormonas GH, IGF-I y IGF-II, además de tener efecto directo en los procesos metabólicos, promueve el crecimiento óseo, la síntesis de proteínas en el músculo y la secreción de ácidos grasos del tejido adiposo, reproducción y osmoregulación en peces marinos (McCormick y Bradshaw, 2006). Tang y col., (2001), encontró niveles elevados de GH en pez gato (*Ictalurus punctatus*), cuando fueron expuestos a aguas salobres, lo que indicaría su participación en procesos de osmorregulación. Los estudios en diversas especies han mostrado también que la GH es un potente regulador de la expresión del IGF-I y del IGF-II (Ferry y col., 1999; Kajimura y col., 2001; Le Roith 2003; Biga y col., 2004, Peterson y col., 2004). Así mismo Haddad (2002) reporta que GH, IGF-I y IGF-II son reguladas en peces alimentados con aceite de pescado incrementando su expresión, lo que indicaría estrés por osmoregulación debido a un desbalance celular redox.

CONCLUSIONES

La técnica de DD nos ha permitido identificar secuencias de Tilapia del Nilo homólogas a los genes CNTN3, EPD1 y PLXNA4 que participan en procesos neuronales como la regeneración axonal y el desarrollo del sistema nervioso. Esta expresión diferencial manifestada por la presencia-ausencia o intensidad variable de las bandas amplificadas entre los grupos alimentados ad libitum y una vez al día, nos permite concluir que la frecuencia de alimentación de una vez al día ha influenciado negativamente en la expresión de estos genes.

En la observación de distintos patrones de expresión entre los peces alimentados con aceites vegetales frente a los alimentados con aceite de pescado, se identificaron genes como LAMA3, STRIP, GABARAPL1, GAPDH y TAPBP1, cuyas funciones son conocidas en mamíferos por su implicación en la formación y elasticidad de la piel, organización del citoesqueleto, inmunidad, transporte de antígenos y procesos de respuesta frente a infecciones, nos permiten pensar que los ácidos grasos vegetales participan activamente en la modulación de genes implicados en la respuesta inmune.

El aumento significativo de la expresión de los genes ELOVL6, SCD y FAD6 en el grupo de peces alimentados con aceites vegetales, nos confirma que la dieta basada en aceites vegetales influye directamente sobre la actividad de enzimas que participan en la elongación y desaturación de los ácidos grasos.

La sustitución del aceite de pescado por aceites vegetales de la dieta, disminuyeron la expresión de determinados genes que participan en situaciones de estrés por osmorregulación, choque térmico y respuesta inmune sugiriendo mejor adaptabilidad al medio, mayor aprovechamiento de los nutrientes y resistencia al estrés.

A vista de los resultados, consideramos que es posible reemplazar el aceite de pescado por aceites vegetales en la dieta de la Tilapia del Nilo sin inhibir la síntesis de los ácidos grasos PUFA de cadena larga ni afectar el bienestar animal.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Moneim AM, El-Saad AMA, Hussein HK, Dekinesh SI.** (2012) Gill Oxidative Stress and Histopathological Biomarkers of Pollution Impacts in Nile Tilapia from Lake Mariut and Lake Edku, Egypt. *Journal of Aquatic Animal Health*. 24(3): 148-160
- Adam PJ, Clesham GJ, Flynn PD, Weissberg PL.** (2000) Identification and characterisation of transforming growth factor beta-regulated vascular smooth muscle cell genes. *Cytokine* 12: 348-354.
- Ahsan B, Kobayashi D, Yamada T, Kasahara M, Sasaki S, Saito TL, Nagayasu Y, Doi K, Nakatani Y, Qu W, Jindo T, Shimada A, Naruse K, Toyoda A, Kuroki Y, Fujiyama A, Sasaki T, Shimizu A, Asakawa S, Nobuyoshi Shimizu N, Shin-ichi Hashimoto S, Jun Yang J, Yongjun Lee Y, Kouji Matsushima K, Sumio Sugano S, Mitsuru Sakaizumi M, Takanori Narita T, Ohishi K, Haga S, Ohta F, Nomoto H, Nogata K, Morishita T, Endo T, Shin-I T, Takeda H, Kohara Y, Morishita S.** (2008) UTGB/medaka: genomic resource database for medaka biology. *Nucleic Acids Res*. 36:D747-D752
- Akiyama DM.** (1988) Soybean meal utilization in fish feeds. Paper presented at the Korean Feed Association Conference, Seoul, Korea. Agosto 1988. 12p. Singapore: American Soybean Association.
- Ali A, Al-Asgah NA.** (2001) Effect of feeding different carbohydrate to lipid ratios on the growth performance and body composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Animal Research*. 50: 91-100.
- Almeida JA, Diniz YS, Marques SFG, Faine LA, Ribas BO, Burneiko RC, Novelli ELB.** (2002) The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ Int*. 27:673–679
- Alves-Costa F, Wasko AP.** (2015) DDRT-PCR approaches applied for preeminent results in the isolation of DETs from fish brain tissues. *Braz J Biol*. 75:224-8
- Allmann DW, Gibson DW** (1969) Fatty acid synthesis during early linoleic acid deficiency in the mouse. *Journal of Lipid Research* 6:51–62
- Aoki T, Hirano I, Kondo H, Hikima J, Jung TS.** (2011) Microarray technology is an effective tool for identifying genes related to the aquacultural improvement of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*. 6:39-43
- Aparicio S, Chapman J, Stupka E, Putnam N, Chia JM, Dehal P, Christoffels A, Rash S, Hoon S, Smit A, Gelpke MD, Roach J, Oh T, Ho IY, Wong M, Detter C, Verhoef F, Predki P, Tay A, Lucas S, Richardson P, Smith SF, Clark MS, Edwards YJ, Doggett N, Zharkikh A, Tavtigian SV, Pruss D, Barnstead M, Evans C, Baden H, Powell J, Glusman G, Rowen L, Hood L, Tan YH, Elgar G, Hawkins T, Venkatesh B, Rokhsar D, Brenner S.** (2002)

Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* 297:1301–1310.

Apostolopoulos J, Sparrow RL, McLeod JL, Collier FM, Darcy PK, Slater HR, Ngu C, Gregorio-King CC, Kirkland MA (2001) Identification and characterization of a novel family of mammalian endymin-related proteins (MERPs) in hematopoietic, nonhematopoietic, and malignant tissues. *DNA Cell Biol* 20:625-35.

Arem H, Neuhouwer ML, Irwin ML, Cartmel B, Lu L, Risch H, Mayne ST, Yu H. (2013) Omega-3 and omega-6 fatty acid intakes and endometrial cancer risk in a population-based case-control study. *Eur J Nutr.* 52:1251-60.

Asadi-Samani M, Bahmani M, Rafieian-Kopaei M. (2014) The chemical composition, botanical characteristic and biological activities of *Borago officinalis*: a review. *Asian Pac J Trop Med*, 7: S22–S28.

Austin GL, Ogden LG, Hill JO. (2011) Trends in carbohydrate, fat, and protein intakes and association with energy intake in normalweight, overweight, and obese individuals: 1971-2006. *Am J Clin Nutr.* 93:836-43

Azim ME, Verdegem MC, Mantingh I, Van Dam AA, Beveridge MC. (2003) Ingestion and utilization of periphyton grown on artificial substrates by Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *L. Aquac. Res.* 34: 85-92.

Bai R, You W, Chen J, Huang H, Ke C. (2012) Molecular cloning and expression analysis of GABAA receptor-associated protein (GABARAP) from small abalone, *Haliotis diversicolor*. / *Fish & Shellfish Immunology* 33: 675e682

Bai SW, Herrera-Abreu MT, Rohn JL, Racine V, Tajadura V, Suryavanshi N, Bechtel S, Wiemann S, Baum B, Ridley A. (2011) Identification and characterization of a set of conserved and new regulators of cytoskeletal organization, cell morphology and migration. *BMC Biology.* 9:54

Bang HO, Dyerberg J. (1972) Plasma lipids and lipoprotein in Greenlandic west coast Eskimos. *Acta Med Scand.* 192: 85-94

Bangia N, Cresswell P. (2005) Stoichiometric tapasin interactions in the catalysis of major histocompatibility complex class I molecule assembly. *Immunology* 114:346–353

Barnabe G. (1990) *Aquaculture*. Ellis Horwood Books in Aquaculture and Fisheries Support. Ellis Horwood Ltd.

Barton BA, Iwama GK. (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the stress response and effects of corticosteroids. *Annual Reviews of Fish Diseases* 1: 3–26.

- Bateman A, Sing A, Kral T, Solomon S.** (1989) The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrine Reviews* 10: 92-112
- Bell JG, Sargent JR.** (1992) The incorporation and metabolism of polyunsaturated fatty acids in phospholipids of cultured cells from chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Fish Physiology and Biochemistry* 10: 99-109.
- Bell JG, Tocher DR, Macdonald FM, Sargent JR.** (1995a) Diets rich in eicosapentaenoic acid and γ -linolenic acid affect phospholipid fatty acid composition and production of prostaglandins E1, E2 and E3 in turbot (*Scophthalmus maximus*), a species deficient in $\Delta 5$ fatty acid desaturase. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 53: 279-286.
- Bell MV, Batty RS, Dick JR, Fretwell K, Navarro JC, Sargent JR.** (1995b) Dietary deficiency of docosahexaenoic acid impairs vision at low light intensities in juvenile herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids* 30, 443-449
- Bell JG.** (1998) Current aspects of lipid nutrition in fish farming. In: Black, K.D., Pickering, A.D. (Eds.), *Biology of farmed fish*, Sheffield Academic Press, Sheffield, pp. 114-145.
- Bell JG, McEvoy J, Tocher DR, McGhee F, Campbell PJ, Sargent JR.** (2001) Replacement of fish oil with rape seed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipid compositions and hepatocyte fatty acid metabolism. *J. Nutr.* 131:1535-1543.
- Bell JG, Henderson RJ, Tocher DR, McGhee F, Dick JR, Porter A, Smullen RP and Sargent JR.** (2002) Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. *Journal of Nutrition* 132 (2), 222-230.
- Bell JG, Sargent JR.** (2003) Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture* 218, 491-499.
- Bell JG, Koppe W.** (2011) Lipids in Aquafeeds. p. 22-50. In G.M. Turchini, W-K, Ng, D.R. Tocher (Eds.) *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*, Ch.1, CRC Press, NY
- Benitez-Dorta V, Caballero MJ, Izquierdo MS, Manchado M, Infante C, Zamorano M.J, Montero D.** (2013) Total substitution of fish oil by vegetable oils in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) diets: effects on fish performance, biochemical composition, and expression of some glucocorticoid receptor-related genes. *Fish Physiol Biochem* 39, 335–349.
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L.** (2002) *Biochemistry*. Fifth edition. Capítulo 22.3. Certain Fatty Acids Require Additional Steps for Degradation. On line version: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>

- Berois N, Arezo M y Papa N.** (2011) Gamete interactions in teleost fish: the egg envelope. Basic studies and perspectives as environmental biomonitor. *Biological Research*, 44:119-124.
- Biga PR, Schelling GT, Hardy RW, Cain KD, Overturf K, Ott TL.** (2004) The effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) on tissue IGF-I, IGF-I receptor, and GH mRNA levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 324– 333.
- Binuramesh C, Prabakaran M, Steinhagen D, Michael RD.** (2005) Effect of chronic confinement stress on the immune responses in different sex ratio groups of *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture*, 250: 47-59.
- Bjornsson B, Taranger G, Hansen T, Stefansson S, Haux C.** (1994) The interrelation between photoperiod, growth hormone and sexual maturation of adult Atlantic salmon (*Salmo salar*). *General Comparative Endocrinology* 93: 70-81.
- Bostock J, McAndrew B, Richards R, Jauncey K, Telfer T, Lorenzen K, Little D, Ross L, Handisyde N, Gatward I and Corner R.** (2010) Aquaculture: global status and trends. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 365(1554) Sept 27
- Bougas B, Normandeau E, Pierron F, Campbell PG, Bernatchez L, Couture P.** (2013) How does exposure to nickel and cadmium affect the transcriptome of yellow perch (*Perca flavescens*) – Results from a 1000 candidate gene-microarray. *Aquat Toxicol* 142-143: 355-364
- Brenna JT, Salem N Jr, Sinclair AJ, Cunnane SC.** (2009) Alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 longchain polyunsaturated fatty acids in humans. International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, ISSFAL. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 80(2-3):85-91
- Bruckner-Tuderman L, and Has C.** (2014) Disorders of the cutaneous basement membrane zone—The paradigm of epidermolysis bullosa. *Matrix Biology* 33 (2014) 29– 34
- Burridge L, Weis J, Cabello F, Pizarro J, Bostick K.** (2010) Chemical use in salmon aquaculture: A review of current practices and possible environmental effects. *Aquaculture* 306, 7-23
- Bustin SA.** (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 29(1):23-39.
- Bustin SA, Nolan T.** (2004) Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *J Biomol Tech.* 15:155-166.
- Byon JY, Ohira T, Hirono I, Aoki T.** (2005) Use of a cDNA microarray to study immunity against viral hemorrhagic septicemia (VHS) in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) following DNA vaccination. *Fish Shellfish Immunol.* 18(2):135-47

- Caballero MJ, Obach A, Rosenlund G, Montero D, Gisvold M, Izquierdo MS.** (2002) Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 214:253-271.
- Cabo J, Alonso R, Mata P.** (2012) Omega-3 fatty acids and blood pressure. *Br J Nutr.* 107 Suppl 2:S195-200.
- Calder PC, Field CJ.** (2002) *Fatty acid inflammation and immunity in Nutrition and immune function*. Edited by Calder PC, Field CJ, Gill HS. CABI Publishing. New York. ISBN: 0-85199-583-7, pp 57-92.
- Castell JD, Sinnhuber RO, Wales JH, Lee DJ.** (1972) Essential fatty acids in the diet of rainbow trout (*Salmo gairdneri*): growth, feed conversion and some gross deficiency symptoms. *Journal of Nutrition* 102, 77-86.
- Chávez-Calvillo G, Perez-Rueda E, Lizama G, Zúñiga Aguilar JJ, Gaxiola G, Cuzon G, Arena-Ortiz L.** (2010) Differential gene expression in *Litopenaeus vannamei* shrimp in response to diet changes. *Aquaculture* 300; 137–141
- Clarke SD, Armstrong MK & Jump DB.** (1990) Dietary polyunsaturated fats uniquely suppress rat liver fatty acid synthase and S14 mRNA content. *Journal of Nutrition* 120, 225–231
- Clarke SD.** (2001) Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: A Molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *Journal of Nutrition* 131: 1129-32.
- Cheng Q, Su B, Qin Z, Weng CC, Yin F, Zhou Y, Fobes M, Perera DA, Shang M, Soller F, Shi Z, Davis A, Dunham RA.** (2014) Interaction of diet and the masou salmon $\Delta 5$ -desaturase transgene on $\Delta 6$ -desaturase and stearoyl-CoA desaturase gene expression and N-3 fatty acid level in common carp (*Cyprinus carpio*). *Transgenic Res.*23(5):729-42
- Chistiakov DA, Tsigenopoulos CS, Lagnel J, Guo YM, Hellemans B, Haley CS, Volckaert FA, Kotoulas G.** (2008) A combined AFLP and microsatellite linkage map and pilot comparative genomic analysis of European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Anim Genet* 39:623–634.
- Christiansen HE, Mehinto AC, Yu F, Perry RW, Denslow ND, Maule AG, Mesa MG.** (2013) Correlation of gene expression and contaminant concentrations in wild largescale sufers: A field-based study. *Sci Total Environ.* 484:379-89
- Cho HP, Nakamura MT, Clarke SD.** (1999a) Cloning, expression and nutritional regulation of the mammalian delta-6-desaturase. *Journal of Biological Chemistry* 274, 471–477

- Cho HP, Nakamura MT, Clarke SD.** (1999b) Cloning, expression and fatty acid regulation of the human delta-5-desaturase. *Journal of Biological Chemistry* 274, 37335–37339
- Cho YS, Lee SY, Kim HK, Nam YK.** (2008) Differential modulations of two glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase mRNAs in response to bacterial and viral challenges in a marine teleost *Oplegnathus fasciatus* (Perciformes). *Fish & Shellfish Immunology* 25: 472–476
- Chypre M, Zaidi N, Smans K.** (2012) ATP-citrate lyase: a mini-review. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422: 1–4
- Daimiel L, Vargas T, Ramírez de Molina A.** (2012) Nutritional genomics for the characterization of the effect of bioactive molecules in lipid metabolism and related pathways. *Electrophoresis*, 33: 2266–2289.
- Degani G, Viola S, Yehuda Y.** (1997) Apparent digestibility of protein and carbohydrate in feed ingredients for adult tilapia. *The Israel Journal of aquaculture – Bamidgeh*, 49:115-123
- Del Rio MJ, Godoy A, Toro A, Orellana R, Cortés ME, Moreno RD, Vigil P.** (2007) La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. *Rev Int Androl.* 5(4):368-73
- Davidson W, Koop B, Jones S, Iturra P, Vidal R, Maass A, Jonassen I, Lien S, Omholt S.** (2010) Sequencing the genome of the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Genome Biol* 11:403
- Deane EE, Kelly SP, Luk JCY, Woo NYS,** (2002) Chronic salinity adaptation modulates hepatic heat shock protein and insulin-like growth factor I expression in black sea bream. *Marine Biotechnology*, 4: 193-205.
- Dempster PW, Beveridge MC, Baird DJ.** (1993) Herbivory in the tilapia *Oreochromis niloticus*: a comparison of feeding rates of phytoplankton and periphyton. *J. Fish Biol.* 43:385-392.
- De Silva SS, Francis DS, Tacon AG.** (2011) Fish Oils in Aquaculture *In Retrospect*. p 1-19. In G.M. Turchini, W-K, Ng, D.R. Tocher (Eds.) *Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds*, Ch.1, CRC Press, NY.
- Devlin TM.** (2004) *Bioquímica*, 4ª edición. Reverté, Barcelona. ISBN 84-291-7208-4
- Dong WR, Xiang LX, Shao JZ.** (2007) Cloning and characterisation of two natural killer enhancing factor genes (NKEF-A and NKEF-B) in pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22: 1-15.
- Duplus E, Glorian M, Forest C.** (2000) Fatty acid regulation of gene transcription. *Journal of Biological Chemistry* 275, 30749–30752
- Dzielska-Olczak M, Nowak JZ.** (2012) Antiinflammatory therapy in osteoarthritis including omega 3 and omega 6 fatty acids. *Pol Merkur Lekarski.* 32(191):329-34.

- Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foulle F.** (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. 86: 839–848
- Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A,** (2009) Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 519–539.
- FAO.** (1999) Desarrollo de la Acuicultura. FAO Orientaciones Técnicas para la Pesca Responsable (<http://www.fao.org/docrep/003/w4493s/w4493s08.htm#bm8>)
- FAO.** (2004) Collation, analysis and dissemination of global and regional fishery statistics. FI Programme Websites, FAO Fishery Information Data and Statistics Unit (FAO-FIDI). FAO, Rome. Retrieved on 20/02/2007 from http://www.fao.org/figis/servlet/static?dom=org&xml=FIDI_STAT_org.xml.
- FAO.** (2006) State of world aquaculture: FAO Fisheries Technical paper Nº500. Rome, FAO. 134p. Disponible en el siguiente enlace de Internet: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0874e/a0874e00.pdf>
- FAO.** (2010) El Estado Mundial de la Pesca y Acuicultura. Roma, FAO 219p. Disponible en el siguiente enlace de Internet: <http://www.fao.org/3/a-i1820s.pdf>
- FAO.** (2012) El Estado Mundial de la Pesca y Acuicultura. Roma, FAO 231 págs. Disponible en el siguiente enlace de Internet: <http://www.fao.org/docrep/016/i2727s/i2727s.pdf>
- Fenech M, El-Sohemy A, Cahill L, Ferguson LR, Tapueru-French CA, Tai ES, Milner J, Koh Ferry Jr RJ, Katz LEL, Grimberg A, Cohen P, Weinzimer SA.** (1999) Cellular actions of insulin-like growth factor binding proteins. *Horm. Metab. Res.* 31, 192–202.
- Figuerola RI, Rodriguez-Sabaris R, Aldegunde M, Soengas JL,** (2000) Effects of food deprivation on 24 h-changes in brain and liver carbohydrate and ketone body metabolism of rainbow trout. *J. Fish Biol.* 57, 631–646.
- Fitzsimmons K.** (2003) World tilapia markets in the 21st century. *5th International Symposium on tilapia Aquaculture*. Rio de Janeiro, Brazil. September 3-7.
- Franch R, Louro B, Tsalavouta M, Chatziplis D, Tsigenopoulos S, Sorropoulou E, Antonello J, Magoulas A, Mylonas C, Babbucci M, Patarnello T, Power D, Kotoulas G, Bargelloni L.** (2006) A genetic linkage map of the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L. *Genetics* 174:851–861
- Friedli M, Guipponi M, Bertrand S, Bertrand D, Neerman-Arbez M, Scott HS, Antonarakis SE, Reymond A.** (2003) Identification of a novel member of the CLIC family, CLIC6, mapping to 21q22.12. *Gene* 320: 31-40.
- Froese R, Pauly D. Editors.** (2010) FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version.

Froyland L, Lie O, Berge RK. (2000) Mitochondrial and peroxisomal beta-oxidation capacities in various tissues from Atlantic salmon *Salmo salar*. *Aquaculture Nutrition* 6(2), 85-89.

García MJ. (2007) Los ácidos grasos omega-3 de cadena larga en la nutrición clínica. *Nutrición Clínica en Medicina*. 1:203-218.

García-Mesa S, Suárez MD, Rodríguez-Rúa A, Cárdenas S, García-Gallego M, (2014) Productive and physiological implications of different feeding frequencies in meagre *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). *Aquac. Engineering* 60: 6-13

Genet C, Dehais P, Palti Y, Gao G, Gavory F, Wincker P, Quillet E, Boussaha M. (2011) Analysis of BAC-end sequences in rainbow trout: content characterization and assessment of synteny between trout and other fish genomes. *BMC Genomics*, 12:314.

Gentle A, Anastopoulos F, McBrien NA. (2001) High-resolution semi-quantitative realtime PCR without the use of a standard curve. *BioTechniques* 31: 502-508.

Ghioni C, Tocher DR, Bell MV, Dick JR, Sargent JR. (1999) Low C18 to C20 fatty acid elongase activity and limited conversion of stearidonic acid, 18:4(n-3), to eicosapentaenoic acid, 20:5(n-3), in a cell line from the turbot, *Scophthalmus maximus*. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular and Cell Biology of Lipids* 1437, 170–181.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6(10): 995-1001.

Gillies PJ. (2003) Nutigenomics: the rubicon of molecular nutrition. *J Am Diet Assoc*, 103 (12 Supl. 2):S50-5.

Guillaume J, Kaushik S, Bergot P, Metailler R. (2004) Nutrición y alimentación de peces y crustáceos. *Ediciones Mundi-Prensa*. Madrid, España. 475 pp.

González-Rovira A, Mourente G, Zheng X, Tocher DR, Pendón C. (2009) Molecular and functional characterization and expression analysis of a $\Delta 6$ fatty acyl desaturase cDNA of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) *Aquaculture* 298; 90–100

Govoroun M, Le Gac F, Guiguen Y. (2006) Generation of a large scale repertoire of Expressed Sequence Tags (ESTs) from normalized rainbow trout cDNA libraries. *BCM Genomics* 7:196

Gupta MV, Acosta BO. (2004) Tilapia farming: A review of global tilapia farming practices. In land Aquaculture (<http://www.enaca.org/modules/news/article.php?storyid=453>)

Gutekunst CA, Stewart EN, Franz CK, English AW, Gross RE. (2012) PlexinA4 distribution in the adult rat spinal cord and dorsal root ganglia. *J. Chem. Neuroanat.* **44** (1): 1–13.

- Guyomard R, Mauger S, Tabet-Canale K, Martineau S, Genet C, Krieg F, Quillet E.** (2006) A type I and type II microsatellite linkage map of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with presumptive coverage of all chromosome arms. *BMC Genomics*, 7:302.
- Guyon R, Rakotomanga M, Azzouzi N, Coutanceau JP, Bonillo C, D'Cotta H, Pepey E, Soler L, Rodier-Goud M, D'Hont A, Conte MA, van Bers NE, Penman DJ, Hitte C, Crooijmans RP, Kocher TD, Ozouf-Costaz C, Baroiller JF, Galibert F.** (2012) A high-resolution map of the Nile tilapia genome: a resource for studying cichlids and other percomorphs. *BMC Genomics*, 13:222. doi: 10.1186/1471-2164-13-222.
- Haddad JJ,** (2002) Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cellular Signalling*, 14: 879-897.
- Halminski MA, Marsh JB, Harrison EH.** (1991) Differential Effects of Fish Oil, Safflower Oil and Palm Oil on Fatty Acid Oxidation and Glycerolipid Synthesis in Rat Liver, *J. Nutr.* 121, 1554-1561.
- Halver JE.** (1976) Formulating practical diets of fish. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 33:1032-1039.
- Hardy RW.** (2008) Farmed fish diet requirements for the next decade and implications for global availability of nutrients. In: *Alternative Protein Sources in Aquaculture Diets* (ed. by C. Lim, C.D. Webster&C.S. Lee), pp. 1–15. Haworth Press, New York.
- Hastings, N, Agaba M, Tocher DR, Leaver MJ, Dick JR, Sargent JR. and Tele AJ.** (2001) A vertebrate fatty acid desaturase with $\Delta 5$ and $\Delta 6$ activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(25):14304-14309
- He A, Luo Y, Yang H, Liu L, Li S, Wang Ch.** (2011). Complete mitochondrial DNA sequences of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Blue tilapia (*Oreochromis aures*): genome characterization and phylogeny applications. *Mol. Biol Rep.* 38:2015-2021.
- He A, Liu C, Chen L, Ning L, Qin J, Li J, Zhang M, Du Z.** 2015. Molecular characterization, transcriptional activity and nutritional regulation of peroxisome proliferator activated receptor gamma in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology*. In Press doi:10.1016/j.ygcen.2015.05.008
- Heid CA, Stevens J, Livack K, Williams PM.** (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994.
- Hempel E.** (2002). Tilapia: The new whitefish. *Seafood International* 17:16-20.
- Henderson RJ, Tocher DR.** (1987) The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog Lipid Res.* 26(4):281-347.

- Henderson RJ, Park MT, Sargent JR.** (1995) The desaturation and elongation of (14) C-labelled polyunsaturated fatty acids by pike (*Esox lucius* L.) in vivo. *Fish Physiol Biochem.* 14(3):223-35.
- Henderson, R.J.** (1996) Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. *Archives of Animal Nutrition-Archiv Fur Tierernahrung* 49(1), 5-22.
- Hernandez A, Martin Vasallo P, Torres Ramirez A, and Salido E.** (1994) RNA analysis: The study of genic expression. *Nefrología* 14: 145-162.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R.** (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* (NY) 11:1026-1030.
- Hong HN, Kim HN, Park KS, Lee SK, Gu MB.** (2007) Analysis of the effects diclofenac has on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. *Chemosphere* 67; 2115-2121
- Hsieh SL, Liu RW, Wu CH, Cheng WT, Kuo CM.** (2003). cDNA nucleotide sequence coding for stearoyl-CoA desaturase and its expression in the zebrafish (*Danio rerio*) embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 66 (4), 325–333.
- Hsieh SL, Hu CY, Hsu YT, Hsieh TJ.** (2007) Influence of dietary lipids on the fatty acid composition and stearoyl-CoA desaturase expression in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*) under cold shock. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 147(3):438-44.
- Hulata G, Wohlfarth GW, Halevy A.** (1986) Mass selection for growth rate in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 57:177-184.
- Hyllner SJ, Westerlund L, Olsson P y Schopen A.** (2001) Cloning of rainbow trout egg envelope proteins: members of a unique group of structural proteins. *Biological Reproduction* 64:805-811
- Ide T, Kobayashi H, Ashakumary T, Mizugaki M.** (2000) Comparative Effects of Perilla and Fish Oils on the Activity and Gene Expression of Fatty Acid Oxidation Enzymes in Rat Liver. *Biochim. Biophys. Acta* 1485, 23-35.
- Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A, Auffray C.** (2005) Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33:e56.
- Iwama GK, Afonso OB, Vijayan MM.** (2004) Stress in Fish. *AquaNet Workshop on Fish Welfare*. Campbell River, B. C. Canada, pp. 1-9.
- Iwama GK, Afonso LOB, Vijayan MM.** (2006) Stress in fishes In: Evans DH & Claiborne JB, editors. *The Physiology of Fishes* (3rd Ed.), Boca Raton, FL: CRC Press. 319–342.

- Izquierdo M, Obach A, Arantzamendi L, Montero D, Robaina L, Rosenlund G.** (2003) Dietary lipid sources for seabream and seabass: growth performance, tissue composition and flesh quality. *Aquacult. Nutr.* 9, 397–407.
- Izquierdo MS.** (2005) Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. *Cahiers Options Méditerranéennes* 63:91–102.
- Jackson PA, Reay JL, Scholey AB, Kennedy D.** (2012) Docosahexaenoic acid-rich fish oil modulates the cerebral hemodynamic response to cognitive tasks in healthy young adults. *Biological Psychology* 89(1):183-90.
- Jaillon O, Aury JM, Brunet F, Petit JL, Stange-Thomann N, Mauceli E, Bouneau L, Fischer C, Ozouf-Costaz C, Bernot A, Nicaud S, Jaffe D, Fisher S, Lutfalla G, Dossat C, Segurens B, Dasilva C, Salanoubat M, Levy M, Boudet N, Castellano S, Anthouard V, Jubin C, Castelli V, Katinka M, Vacherie B, Biémont C, Skalli Z, Cattolico L, Poulain J, De Berardinis V, Cruaud C, Duprat S, Brottier P, Coutanceau JP, Gouzy J, Parra G, Lardier G, Chapple C, McKernan KJ, McEwan P, Bosak S, Kellis M, Volff JN, Guigó R, Zody MC, Mesirov J, Lindblad-Toh K, Birren B, Nusbaum C, Kahn D, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Schachter V, Quétier F, Saurin W, Scarpelli C, Wincker P, Lander ES, Weissenbach J, Roest Crollius H.** (2004) Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate protokaryotype. *Nature* 431:946–957.
- Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A.** (2006) Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* 45, 237–249.
- Jansen GA, Wanders RJ.** (2006) Alpha-Oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 1763, 1403–1412.
- Jauncey K.** (2000). Nutritional requirements. In M.C.M. Beveridge & B.J. McAndrew. (Eds.). *Tilapias: Biology and Exploitation*. Fish and Fisheries Series 25. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands. 327-375 pp.
- Jaya-Ram A, Kuah M-K, Lim P-S, Kolkovski S, Shu-Chien AC.** (2008) Influence of dietary HUFA levels on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs expression in female zebrafish *Danio rerio*. *Aquaculture* 2008, 277(3–4):275-281
- Jeffcoat R, Brawn PR, Safford R, James AT.** (1977) Properties of rat liver microsome stearyl-coenzyme A desaturase. *Biochem. J.* 161, 431–437.
- Ji H, Cao YZ, Liu P, Su SS, Lin YQ, Cao FY, Oku H, Zhou JS, Ye YT.** (2009) Effect of dietary HUFA on the lipid metabolism in grass carp *Ctenopharyngodon idellus*. *Acta Hydrobiol Sinica* 5, 881–889.

Ji H, Li J, Liu P. (2011) Regulation of growth performance and lipid metabolism by dietary n-3 highly unsaturated fatty acids in juvenile grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 159(1):49-56

Jones FC, Grabherr MG, Chan YF, Russell P, Mauceli E, Johnson J, Swofford R, Pirun M, Zody MC, White S, Birney E, Searle S, Schmutz J, Grimwood J, Dickson MC, Myers RM, Miller CT, Summers BR, Knecht AK, Brady SD, Zhang H, Pollen AA, Howes T, Amemiya C, Baldwin J, Bloom T, Jaffe DB, Nicol R, Wilkinson J, Lander ES, Di Palma F, Lindblad-Toh K, Kingsley DM. (2012) Broad Institute Genome Sequencing Platform Whole Genome Assembly Team: The genomic basis of adaptive evolution in threespine sticklebacks. *Nature* 2012, 484:55–61.

Jordal AE, Torstensen BE, Tsoi S, Tocher DR, Lall SP and Douglas S. (2005) Dietary Rapeseed Oil Affects the Expression of Genes Involved in Hepatic Lipid Metabolism in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) *J. Nutr.* 135: 2355-2361, 2005

Jump DB, Clarke SD, Thelen A, Liimatta M, Ren B, Badin M. (1996) Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Prog Lipid Res.* 35(3):227-41.

Jump DB, Clarke SD. (1999) Regulation of gene expression by dietary fat. *Annual Review of Nutrition*; 19: 63-90

Jump DB. (2004) Fatty acid regulation of gene transcription. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41:41–78.

Jump DB. (2008) N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr Opin Lipidol.* 19(3): 242–247.

Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Demeure O, and Christian B. (2008) Docosahexaenoic Acid (DHA) and Hepatic Gene Transcription. *Chem Phys Lipids.* 153(1): 3–13.

Jump DB, Depner CM, Tripathy S. (2012) Omega-3 fatty acid supplementation and cardiovascular disease. *J. Lipid Res* 53(12):2525-45.

Jurivich DA, Sistonen L, Sarge KD, Morimoto RI. (1994) Arachidonate is a potent modulator of human heat-shock gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2280–2284.

Kajimura S, Uchida K, Yada T, Riley LG, Byatt JC, Collier RJ, Aida K, Hirano T, Grau EG. (2001) Stimulation of insulin-like growth factor-I production by recombinant bovine growth hormone in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiol. Biochem.* 25, 221– 230.

Kapler R, Ress C, Drevnick P, Weber D, Sandheinrich M y Carvan M (2006) Gene Expression Changes RELated to Endocrine Function and Decline in Reproduction in

Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) after Dietary Methylmercury Exposure. *Environmental Health Perspectives*. 114, 9:1337-1343.

Kaput J, Rodríguez RL. (2004) Nutritional genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol Genomics* 15(16):166-77.

Karapanagiotidis IT, Bell MV, Little DC, Yakupitiyage A. (2007) Replacement of Dietary Fish Oils by Alpha-Linolenic Acid-Rich Oils Lowers Omega 3 Content in Tilapia Flesh. *Lipids*. 42:547-559.

Kasahara M, Naruse K, Sasaki S, Nakatani Y, Qu W, Ahsan B, Yamada T, Nagayasu Y, Doi K, Kasai Y, Jindo T, Kobayashi D, Shimada A, Toyoda A, Kuroki Y, Fujiyama A, Sasaki T, Shimizu A, Asakawa S, Shimizu N, Hashimoto S, Yang J, Lee Y, Matsushima K, Sugano S, Sakaizumi M, Narita T, Ohishi K, Haga S, Ohta F, Nomoto H, Nogata K, Morishita T, Endo T, Shin-I T, Takeda H, Morishita S, Kohara Y. (2007) The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*, 447:714–719.

Katagiri T, Kidd C, Tomasino E, Davis JT, Wishon C, Stern JE, Carleton KL, Howe AE, Kocher TD. (2005) A BAC-based physical map of the Nile tilapia genome. *BMC Genomics*, 6:89.

Key TJ, Thorogood M, Appleby PN, Burr ML. (1996) Dietary habits and mortality in 11,000 vegetarians and health conscious people: results of a 17 year follow up. *BMJ*. 28; 313(7060):775-9.

Key TJ, Fraser GE, Thorogood M, Appleby PN, Beral V, Reeves G, Burr ML, Chang-Claude J, Frentzel-Beyme R, Kuzma JW, Mann J, McPherson K. (1998) Mortality in vegetarians and non-vegetarians: a collaborative analysis of 8300 deaths among 76,000 men and women in five prospective studies. *Public Health Nutr*. 1(1):33-41.

Kikuno R, Sato A, Mayer WE, Shintani S, Aoki T, Kleiny J. (2004) Clustering of C-type lectin natural killer receptor-like loci in the bony fish *Oreochromis niloticus*. *Scandinavian Journal of Immunology*, 59: 133-142.

Kocher TD, Lee WJ, Sobolewska H, Penman D, McAndrew B. (1998) A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics*, 148(3):1225–1232.

Königstorfer A, Sterrer S, Eckerskorn C, Lottspeich F, Schmidt R, Hoffmann W. (1989a) Molecular characterization of an ependymin precursor from goldfish brain. *J Neurochem*. 52(1):310-2

Königstorfer A, Sterrer S., Hoffmann W. (1989b) Biosynthesis of ependymins from goldfish brain. *J. Biol. Chem*. 264(23):13689-92

Koven W, Barr Y, Lutzky S, Ben Atia I, Weiss R, Harel M, Behrens P, Tandler A. (2001) The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture* 193, 107-122.

- Kuhl H, Sarropoulou E, Tine M, Kotoulas G, Magoulas A, Reinhardt R.** (2011) A Comparative BAC map for the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *J Biomed Biotechnol* 2011:329025.
- Kumar V, Delovith T.** (2014) Different subsets of natural killer T cells may vary in their roles in health and disease. *Immunology*, 142, 321–336
- Landis ED, Palti Y, Dekonin J, Drew R, Phillips RB, Hansen JD.** (2006) Identification and regulatory analysis of rainbow trout tapasin and tapasin-related genes. *Immunogenetics* 58: 56–69
- Landschulz KT, Jump DB, MacDougald OA & Lane MD.** (1994) Transcriptional control of the stearyl-CoA desaturase-1 gene by polyunsaturated fatty acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 200, 763-768.
- Leaver MJ, Villeneuve LAN, Obach A, Jensen L, Bron JE, Tocher DR, Taggart JB.** 2008). Functional genomics reveals increases in cholesterol biosynthetic genes and highly unsaturated fatty acid biosynthesis after dietary substitution of fish oil with vegetables oils in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC Genomics* 9, 299.
- Lee BY, Lee WJ, Streelman JT, Carleton KL, Howe AE, Hulata G, Slettan A, Stern JE, Terai Y, Kocher TD.** (2005) A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis* spp.). *Genetics*, 170:237-44.
- Lee BY, Howe A, Conte M, D'Cotta H, Peppey E, Baroiller J-F, Di Palma F, Carleton K, Kocher T.** (2010) An EST resource for tilapia based on 17 normalized libraries and assembly of 116,899 sequence tags. *BMC Genomics* 11:278
- Lee SH, Shiao YH, Kasprzak KS.** (1999) Nonradioactive mRNA differential display in polyacrylamide mini-gels. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 106: 108-14.
- Lekanne-Deprez RH, Fijnvandraat AC, Ruijter JM, Moorman AFM.** (2002) Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions. *Anal Biochem*. 307:63-69.
- Leng XJ, Wu XF, Tian J, Li XQ, Guan L, Weng DC** (2012) Molecular cloning of fatty acid synthase from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) and the regulation of its expression by dietary fat level. *Aquac Nutr* 18:551–558
- Leong J, Jantzen S, Von Schalburg K, Cooper G, Messmer A, Liao N, Munro S, Moore R, Holt R, Jones S, Davison W, Koop B** (2010) *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome. *BCM Genomics* 11:279
- Le Roith D.** (2003) The insulin-like growth factor system. *Exp. Diabetes Res.* 4, 205–212.

- Li P, Peatman E, Wang S, Feng J, He C, Baoprasertkul P, Xu P, Kucuktas H, Nandi S, Somridhivej B, Serapion J, Simmons M, Turan C, Liu L, Muir W, Dunham R, Brady Y, Grizzle J, Liu Z.** (2007) Towards the ictalurid catfish transcriptome: generation and analysis of 31,215 catfish ESTs. *BMC Genomics*. 18; 8:177
- Liang G, Yang J, Horton JD, Hammer RE, Goldstein JL, Brown MS.** (2002) Diminished Hepatic Response to Fasting/Refeeding and Liver X Receptor Agonists in Mice with Selective Deficiency of Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c. *J. Biol. Chem.* 277, 9520-9528.
- Liang P, Pardee AB.** (1992). Differential Display of Eukaryotic Messenger-RNA by Means of the Polymerase Chain-Reaction. *Science* 257: 967-971.
- Liang P, Pardee AB.** (1998) Differential display. A general protocol. *Mol Biotechnol.* 10: 261-7.
- Liang P.** (2002) A decade of differential display. *Biotechniques*. Aug;33(2):338-44, 346.
- Liu W, Saint DA.** (2002). A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem* 302: 52-59.
- Liu Z.** (2003) A review of catfish genomics: progress and perspectives. *Comp Funct Genomics*, 4:259–265.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** (2001). Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} method. *Methods* 25: 402-408.
- Lien S, Gidskehaug L, Moen T, Hayes BJ, Berg PR, Davidson WS, Omholt SW, Kent MP.** (2011) A dense SNP-based linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals extended chromosome homeologies and striking differences in sex-specific recombination patterns. *BMC Genomics*, 12:615.
- Linares F, Henderson RJ.** (1991) Incorporation of 14C-labeled polyunsaturated fatty acids by juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) in vivo. *Journal of Fish Biology* 38, 335-347.
- Liu ZJ.** (2007) Fish genomics and analytical genetic technologies, with examples of their potential applications in management of fish resources. In: Bartley DM, Harvey BJ, Pullin RSV (eds) FAO Fisheries Proceedings 5. *Workshop on status and trends in aquatic genetic resources*. FAO, Rome, p 145–179
- Liu F, Sun F, Li J, Xia J-H, Lin G, Tu R-J, Yue G-H.** (2013) A microsatellite-based linkage map of salt tolerant tilapia (*Oreochromis mossambicus* x *Oreochromis spp.*) and mapping of sex-determining loci. *BMC Genomics* 14:58

Long Y, Song G, Yan J, He X, Li Q, Cui Z. (2013) Transcriptomic characterization of cold acclimation in larval zebrafish. *BMC Genomics* 14:612

López IP, Marti A, Milagro FI, Zulet MdMde L, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA, De Miguel C. (2003) DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats. *Obes Res*, 11(2):188-94.

López IP, Milagro FI, Marti A, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA, De Miguel C. (2004) Gene expression changes in rat white adipose tissue after a high-fat diet determined by differential display. *Biochem Biophys Res Commun*, 21;318(1):234-9.

Lushchak VI, Lushchak LP, Mota AA, Hermes-Lima M. (2001) Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol.* 280, 100–107.

Ma XY, Qiang J, He J, Gabriel NN, Xu P. (2015) Changes in the physiological parameters, fatty acid metabolism, and SCD activity and expression in juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared at three different temperatures. *Fish Physiol Biochem.* 41(4):937-50

Manzon LA. (2002). The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *General and Comparative Endocrinology*, 125: 291-310.

Marti A, Moreno-Aliaga M^aJ, Zulet M^aA y Martínez JA. Avances en nutrición molecular: nutrigenómica y/o nutrigenética. *Nutr. Hosp.* (2005) XX (3) 157-164

Martin KJ, Pardee AB. (2000) Identifying expressed genes. *P Natl Acad Sci USA.* 97: 3789-3791

Masuda R, Ziemann DA, Ostrowski AC. (2001) Patchiness formation and development of schooling behavior in pacific threadfin *Polydactylus sexfilis* reared with different dietary highly unsaturated fatty acid contents. *J. World Aquac. Soc.* 32, 309-316.

Matsuoka RL, Nguyen-Ba-Charvet KT, Parray A, Badea TC, Chedotal A, Kolodkin AL. (2011) Transmembrane semaphorin signalling controls laminar stratification in the mammalian retina. *Nature* 470: 259-263

McAndrew BJ. (2000) Evolution, phylogenetic relationship, and biogeography. In M.C.M. Beveridge & B.J. McAndrew. (Eds.). *Tilapias: Biology and Exploitation*. London, England: Kluwer Academic Publisher. 1-32 pp.

McCormick SD, (2001) Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American Zoologist* 41, 781–794.

McCormick SD, Bradshaw D. (2006). Hormonal control of salt and water balance in vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 147: 3-8.

McKee JR, McKee T. (2014) Bioquímica. *Las Bases Moleculares de la Vida*. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 5 ed 770 pp.

Melo RV y Cuamatzi TO. (2006) Bioquímica de los procesos metabólicos. Cap.7. Edit. Reverté S.A. Barcelona.

Menoyo D, Lopez-Bote CJ, Bautista JM, Obach A. (2003) Growth, digestibility and fatty acid utilization in large Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed varying levels of n-3 and saturated fatty acids. *Aquaculture* 225, 295-307 (2003).

Menoyo D, Izquierdo MS, Robaina L, Gine's R, López-Bote CJ, Bautista JM. (2004) Adaptation of lipid metabolism, tissue composition and flesh quality in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to the replacement of dietary fish oil by linseed and soyabean oils. *Br. J. Nutr.* 92:41–52.

Menoyo D, Lopez-Bote CJ, Diez A, Obach A, Bautista JM. (2007) Impact of n-3 fatty acid chain length and n-3/n-6 ratio in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diets. *Aquacul.* 267: 248–259.

Mihelakakis A, Tsoikas C, Yoshimatsu T. (2002) Optimization of feeding rate for hatchery-produced juvenile gilthead sea bream *Sparus aurata*. *J. World Aquacult. Soc.* 33, 169–175.

Miranda CD, Tello A, Keen PL. (2013) Mechanisms of antimicrobial resistance in finfish aquaculture environments. *Front Microbiol* 4:233

Mold DE, Kim IF, Tsai CM, Lee D, Chang CY and Huang RC (2001) Cluster of genes encoding the major egg envelope protein of zebrafish. *Molecular Reproduction and Development* 58 4–14

Monroig O, Rotllant J, Cerda-Reverter JM, Dick JR, Figueras A, Tocher DR. (2010) Expression and role of Elovl4 elongases in biosynthesis of very long-chain fatty acids during zebrafish *Danio rerio* early embryonic development. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1801, 1145–1154.

Montero D, Kalinowski T, Obach A, Robaina L, Tort L, Caballero MJ, Acosta F. (2003) Vegetable lipids sources for gilthead seabream (*Sparus aurata*): effects on fish health. *Aquaculture*, 225:353-370.

Montero D, Izquierdo MS. (2010) Welfare and health of fish fed vegetable oils as alternative lipid sources to fish oil. In: Turchini G, Ng W, Tocher D (eds) *Fish oil replacement and alternative lipid sources in aquaculture feeds*. CRC Press, Cambridge, pp 439–486

Montero D, Teova G, Rimoldi S, Tort L, Negrin D, Zamorano M-J, Izquierdo M. (2015) Modulation of adrenocorticotrophin hormone (ACTH)-induced expression of stress-

related genes by PUFA in inter-renal cells from European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Nutr Sci.* 4:e16

Moon YA, Shah NA, Mohapatra S, Warrington JA, Horton JD. (2001) Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem.* 276:45358–45366

Morais S, Pratoomyot J, Taggart J, Bron J, Guy D, Bell J, Tocher D. (2011) Genotype-specific responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) subject to dietary fish oil replacement by vegetable oil: a liver transcriptomic analysis. *BMC Genomics* 12, 255.

Morais S, Edvardsen RB, Tocher DR, Bell JG. (2012a) Transcriptomic analyses of intestinal gene expression of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed diets with Camelina oil as replacement for fish oil. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 161, 283–293.

Morais S, Taggart JB, Guy DR, Bel JG, Tocher DR. (2012b) Hepatic transcriptome analysis of inter-family variability in flesh n–3 long-chain polyunsaturated fatty acid content in Atlantic salmon. *BMC Genomics* 13, 410.

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* 24: 954-962.

Mourete G, Tocher DR, Sargent JR. (1991) Specific accumulation of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in brain lipids during development of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L., *Lipids* 26, 871-877.

Mourete G, Tocher DR. (1993) Incorporation and metabolism of c-14-labeled polyunsaturated fatty-acids in juvenile gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *in vivo*. *Fish Physiology and Biochemistry* 10, 443–453.

Mourete G, Tocher DR. (1994) *In vivo* incorporation and metabolism of [1-¹⁴C] linolenic acid (18:3(n-3)) and [1-¹⁴C] eicosapentaenoic acid (20:5(n-3)) in a marine fish: time-course of the desaturation/elongation pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 1212, 109-118.

Mourete G, Tocher DR. (1998) *In vivo* incorporation and metabolism of [1-¹⁴C] linolenate (18:3n-3) in liver, brain and eyes of juveniles of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* L and gilthead sea bream *Sparus aurata* L. *Fish Physiology and Biochemistry* 18, 149-165.

Mourete G, Diaz Salvago E, Tocher DR, Bell JG. (2000) Effects of dietary polyunsaturated fatty acid/vitamin E (PUFA/tocopherol ratio on antioxidant defence mechanisms of juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Osteichthyes, Sparidae). *Fish Physiology and Biochemistry* 23, 337–351.

- Mourente G, Dick JR, Bell JG, Tocher DR.** (2005). Effect of partial substitution of dietary fish oil by vegetable oils on desaturation and beta-oxidation of [1-C-14]18: 3n-3 (LNA) and [1-C-14]20: 5n-3 (EPA) in hepatocytes and enterocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 248(1-4), 173-186.
- Moyle PB, Cech Jr JJ.** (2000) Fishes. *An Introduction to Ichthyology*. Fourth Edition. Prentice Hall, Inc. USA. 612p.
- Müller-Schmid A, Rinder H, Lottspeich F, Gertzen EM, Hoffmann W.** (1992) Ependymins from the cerebrospinal fluid of salmonid fish: gene structure and molecular characterization. *Gene*, 118(2):189-96
- Mustafa T, Srivastava KC,** (1989) Prostaglandins (eicosanoids) and their role in ectothermic organisms. *Advances in Comparative and Environmental Physiology* 5, 157–207.
- Nakagawa H, Takeda T, Umno T, Mustafa G, Yamashita H.** (1995) Effects of feeding regime on biometric parameters and hepatic enzyme activities of young red sea bream, *Pagrus major*. *J. Fac. Appl. Biol. Sci.*, Hiroshima Univ. 34, 167–178.
- Nakano T.** (2011) Stress in fish. *Yoshoku (Aquaculture Magazine)* 48: 64–67.
- Naruse K, Fukamachi S, Mitani H, Kondo M, Matsuoka T, Kondo S, Hanamura N, Morita Y, Hasegawa K, Nishigaki R, Shimada A, Wada H, Kusakabe T, Suzuki N, Kinoshita M, Kanamori A, Terado T, Kimura H, Nonaka M, Shima A.** (2000) A detailed linkage map of medaka, *Oryzias latipes*: comparative genomics and genome evolution. *Genetics*, 154:1773-1784
- Ng WK, Lu KS, Hashim R, Ali A,** (2000) Effects of feeding rate on growth, feed utilization and body composition of tropical bagrid catfish. *Aquacult. Int.* 8,19–29.
- Niemann CU, Krag TOB, Khurana TS.** (2000) Identification of genes that are differentially expressed in extraocular and limb muscle. *Journal of the Neurological Sciences*. 179:76-84.
- Nimmrich I, Erdmann S, Melchers U, Chtarbova S, Finke U, Hentsch S, Hoffmann I, Oertel M, Hoffmann W, Muller O.** (2001) The novel ependymin related gene *UCC1* is highly expressed in colorectal tumor cells. *Cancer Lett* 165:71-79.
- Ntambi JM.** (1992) Dietary regulation of stearoyl-CoA desaturase-1 gene expression in mouse liver. *Journal of Biological Chemistry* 267, 10925–10930
- Ntambi, JM, Miyazaki M.** (2004) Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog. Lipid. Res.* 43, 91–104.
- Noori N, Dukkipati R, Kovesdy CP, Sim JJ, Feroze U, Murali SB, Bross R, Benner D, Kopple JD, Kalantar-Zadeh K.** (2011) Dietary omega-3 fatty acid, ratio of omega-6 to

omega-3 intake, inflammation, and survival in long-term hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 58(2):248-56.

Nusslein-Volhard C. (1994) Of flies and fish. *Science* 266: 572-574.

Oliva-Teles A. (2012) Nutrition and health of aquaculture fish. *J Fish Dis.* 35(2):83-108

Olsen RE, Henderson FJ, McAndrew BJ. (1990) The conversion of linoleic acid and linolenic acid to longer chain polyunsaturated fatty acids by Tilapia (*Oreochromis nilotica*) in vivo. *Fish Physiology and Biochemistry* 8, 261-270.

Ordovás JM, Corella D. (2004) Nutritional Genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 5: 71-118.

Ortí G, Meyer A. (1996) Molecular evolution of ependymin and the phylogenetic resolution of early divergences among euteleost fishes. *Mol Biol Evol*, 13:556-573.

Ostlund RE, Racette SB, Stenson WF. (2003) Inhibition of cholesterol absorption by phytosterol-replete wheat germ compared with phytosterol-depleted wheat germ. *Am J Clin Nut* 77(6): 1385-1589.

Ottaviani E, Franceschi C. (1998) A New Theory on the Common Evolutionary Origin of Stress response: The invertebrate phagocytic immunocyte as an eye-witnes. *Domestic Animal Endocrinology.* 15: 291-296.

Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, Russell A, DeBose-Boyd, Bashmakov Y, Goldstein JL & Brown MS. (2001) Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulator element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:6027-32.

Palou A, Bonet ML, Pico C, Rodriguez AM. (2004) Nutrigenómica y obesidad. *Rev Med Univ Navarra* 48:36-48.

Pandey S, Parvez S, Sayeed I, Haque R, Bin-Hafeez B, Raisuddin S. (2003) Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *The Science of the Total Environment* 309: 105–115

Panserat S, Hortopan G, Plagnes-Juan E, Kolditz C, Lansard M, Skiba-Cassy S, Esquerre D, Geurden I, Médale F, Kaushik S, Corraze G. (2009) Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver. *Aquaculture* 294: 123–131.

Park BK, Park S, Park JB, Park MC, Min TS, Jin M. (2012) Omega-3 fatty acids suppress Th2-associated cytokine gene expressions and GATA transcription factors in mast cells. *J Nutr Biochem.* 24(5):868-76

- Peterson B, Waldbieser G, Bilodeau L.** (2004) IGF-I and IGF-II mRNA expression in slow and fast growing families of USDA103 channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Biochemistry and Physiology Part A* 139; 317– 323
- Patterson E, Wall R, Fitzgerald GF, Ross RP, Stanton C.** (2012) Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids. *J Nutr Metab* 539426.
- Pégorier J-P, Cedric Le May, Girard Jean.** (2004) Control of Gene Expression by Fatty Acids. *J. Nutr.* 1, vol. 134 no. 9
- Pérez Jiménez A, Hidalgo MC, Morales AM, Arizcun M, Abellán E, Cardenete G,** (2009) Use of different combinations of macronutrients in diets for dentex (*Dentex dentex*): effects on intermediary metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 152, 314–321.
- Pfaffl MW, Horgan GW and Dempfle L.** (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, 9–36.
- Pierce AL, Dickey JT, Larsen DA, Fukada H, Swanson P, Dickhoff WW,** (2004) A quantitative real-time RT-PCR assay for salmon IGF-I mRNA, and its application in the study of GH regulation of IGF-I gene expression in primary culture of salmon hepatocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135, 401– 411.
- Pinto RD, Da Silva DV, Pereira PJB, Dos Santos NMS.** (2012) Molecular cloning and characterization of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) Tapasin. *Fish & Shellfish Immunology* 32: 110-120
- Polakof S, Míguez JM, Soengas JL,** (2007) Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: dependence on feeding. *Comp. Biochem. Physiol.* 147, 363–374.
- Polley SD, Tikun PE, Trueman RT, Caddick MX, Morozov IY, Cossins AR,** (2003) Differential expression of cold- and diet-specific genes encoding two carp liver $\Delta 9$ -acyl-CoA desaturase isoforms. *Am. J. Physiol.* 284, R41–R50.
- Popma T, Masser M.** (1999) Tilapia: life history and biology. Southern Regional Aquaculture Center. *SRAC Publication* No. 283.
- Pratoomyot J, Bendiksen EÅ, Bell JG, Tocher DR.** (2008) Comparison of effects of vegetable oils blended with southern hemisphere fish oil and decontaminated northern hemisphere fish oil on growth performance, composition and gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 280, 170-178.
- Prunet P, Overli O, Douxfils J, Bernardini G, Kestemont P, Baron D.** (2012) Fish welfare and genomics. *Fish Physiol Biochem* 38: 43–60.

- Ragunetti M, Adams ML, Guimarães ATB, Sponchiado G, Carvalho de Vasconcelos E, Ribas de Oliveira CM,** (2011) Ibuprofen Genotoxicity in Aquatic Environment: An Experimental Model Using *Oreochromis niloticus*. *Water Air Soil Pollut* 218:361–364.
- Rainuzzo JR, Reitan KI, Olsen Y.** (1997) The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 155, 103-115.
- Rakocy JE, Masser MP and Losordo TM.** (2006) Recirculating Aquaculture Tank Production Systems: Aquaponics—Integrating Fish and Plant Culture. *SRAC Publication* No. 454. 16 pp.
- Rapoport SI.** (2008) Arachidonic acid and the brain. *J Nutr*, 138 (12):2515-20.
- Rauta PR, Nayak B, Das S.** (2012) Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunology Letters*, vol. 148, no. 1, pp. 23–33.
- Rexroad C III, Palti Y, Gahr S, Vallejo R** (2008) A second generation genetic map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *BCM Genet* 9:74–88
- Ridner E, Gamberale MC, Aragona SH, Baseile R, Saad G, Garcia E, Marsó A, Lozano MG.** (2009) Nutrigenómica: Revisión del Estado Actual y Aplicaciones. *Actualización en Nutrición*. Vol 10 – Nº2
- Rise ML, Von Schalburg KR, Brown GD, Mawer MA, Devlin RH, Kuipers N, Busby M, Beetz-Sargent M, Alberto R, Gibbs AR, Hunt P, Shukin R, Zeznik JA, Nelson C, Jones SR, Rico A, Satapornvanit K, Haque MM, Min J, Niguyen PT, Telfer TC, Van den Brink PJ** (2012) Use of chemicals and biological products in Asian aquaculture and their potential environmental risks: a critical review. *Aquaculture* 4: 75-93
- Robaina L, Schuchardt D.** (2009) Proteínas en dietas para peces. En: Sanz. F. (Ed). *La nutrición y alimentación en piscicultura*. Fundación observatorio español de acuicultura. Consejo superior de investigaciones científicas. Ministerio de medio ambiente y medio rural y marino. Madrid. pp. 89-150.
- Roberts RJ, Agius C, Saliba C, Bossier P, Sung YY.** (2010) Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *J Fish Dis* 33:789–801
- Robison B, Drew R, Murdoch G, Powell M, Rodnick K, Settles M, Stone D, Churchill E, Hill R, Papasani M, Lewis S, Hardy R.** (2008) Sexual dimorphism in hepatic gene expression and the response to dietary carbohydrate manipulation in the zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol Part D* 2:141–154
- Roche H, Bogé G.** (1996) Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Marine Environmental Research*, 41: 27-43.

- Roest Crollius H, Jaillon O, Bernot A, Dasilva C, Bouneau L, Fischer C, Fizames C, Wincker P, Brottier P, Quétier F, Saurin W, Weissenbach J.** (2000) Estimate of human gene number provided by genome-wide analysis using *Tetraodon nigroviridis* DNA sequence. *Nat. Genet.* 25: 235-238.
- Romero N, Robert P, Masson L, Luck C, Buschmann L.** (1996) Fatty acid composition and cholesterol content in naturally canned jurel, sardine, salmon, and tuna. *Arch. Latinoam Nutr.* 46(1):75-7.
- Rothenberg EV.** (2001) Mapping of complex regulatory elements by pufferfish/zebrafish transgenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6540-6542.
- Ruane N, Wendeleaar Bonga S, Balm P.** (1999) Differences between rainbow trout and brown trout in the regulation of the pituitary-interrenal axis and physiology performance during confinement. *General and Comparative Endocrinology* 115, 210-219.
- Russo Gian Luigi.** (2009) Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical pharmacology* 77, 937– 946.
- Rowley AF, Knight J, Lloyd-Evans P, Holland JW, Vickers PJ.** (1995) Eicosanoids and their role in immune modulation in fish a brief overview. *Fish and Shellfish Immunology*, 5, 549–567.
- Saera-Vila A, Caldach-Giner JA, Prunet P, Pérez-Sánchez J.** (2009) Dynamics of liver GH/IGF axis and selected stress markers in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) exposed to acute confinement: differential stress response of growth hormone receptors. *Comparative Bio chemistry and Physiology – Part A*, 154: 197-203.
- Sakamoto T, McCormick SD.** (2006) Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *General and Comparative Endocrinology*, 147: 24-30.
- Salas-Leiton E, Coste O, Ascencio E, Infante C, Cañavate JP.** (2012) Desamethasone modulates expression of genes involved in the innate immune system, growth and stress and increases susceptibility to bacterial disease in Senegalese sole (*Solea semegalensis* Kaup, 1858). *Fish Shellfish Immunol.* 32:769-778.
- Salati LM, Clarke SD.** (1986) Fatty acid inhibition of hormonal induction of acetyl-Co enzyme A carboxylase in hepatocyte monolayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 246, 82–90
- Samples BL, Pool GL, Lumb RH.** (1999) Polyunsaturated fatty acids enhance the heat induced stress response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes. *Comp Biochem Physiol Part B: Biochem Mol Biol* 123, 389–397.

Sánchez-Muros MJ, Gómez-Milán E. (2001) Efecto del estrés en los peces. En: *Universidad Internacional del Mar: Acuicultura II*. Editado por S. Zamora y F. J. Martínez. Universidad de Murcia, pp. 57-69.

Santerre A, Téllez-Bañuelos MC, Casas-Solís J, Castro-Félix P, Huízar-López MR, Zaitseva GP, Horta-Fernández JL, Trujillo-García EA, de la Mora-Sherer D, Palafox-Luna JA, Juárez-Carrillo E. (2015) $\Delta 6$ -fatty acid desaturase and fatty acid elongase mRNA expression, phagocytic activity and weight-to-length relationships in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed alternative diets with soy oil and a probiotic. *Genet Mol Res.* 22;14(3):11222-11234.

Sargent JR. (1995) Origin and functions of egg lipids: nutritional implications. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Broodstock management and egg and larval quality*, Blackwell Science, Berlin, pp. 353-372.

Sargent JR, Bell JG, Bell MV, Hendersson RJ, Tocher DR. (1995) Requirement criteria for essential fatty acids. *Journal of applied Ichthyology* 11, 183-198.

Sargent JR, McEvoy L, Bell JG. (1997) Requeriments, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture* 155, 117-127.

Sargent J, Bell G, McEvoy L, Tocher D, Estevez A. (1999a) Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture* 177(1-4), 191-199.

Sargent J, McEvoy L, Estevez A, Bell G, Bell M, Henderson J, Tocher D. (1999b) Lipid nutrition of marine fish during early development current status and future directions. *Aquaculture*, 179, 217-229.

Sargent JR, Tocher DR, Bell JG. (2002) The lipids. p. 181-257. In J.E. Halver and R.W. Hardy (Eds.) *Fish Nutrition*, 3rd Edition, Ch.4, Academic Press, San Diego.

Sarropoulou E, Franch R, Louro B, Power D, Bargelloni L, Magoulas AN, Senger F, Tsalavouta M, Patarnello T, Galibert F, Kotoulas G, Geisler R. (2007) A gene-based radiation hybrid map of the gilthead sea bream *Sparus aurata* refines and exploits conserved synteny with *Tetraodon nigroviridis*. *BCM Genomics* 8:44

Sartelet A, Harland C, Tamma N, Karim L, Bayrou C, Li W, Ahariz N, Coppieters W, Georges M, Charlier C. (2015) A stop-gain in the *laminin, alpha 3* gene causes recessive junctional epidermolysis bullosa in Belgian Blue cattle. *Animal Genetics*, 46: 566–570.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. (2000). Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal. Biochem* 285: 194-204.

Seale AP, Yamaguchi Y, Johnstone WM, Borski RK, Lerner DT, Grau EG. (2013) Endocrine regulation of prolactin cell function and modulation of osmoreception in the Mozambique tilapia. *General and Comparative Endocrinology* 192; 191-203

- Sealey WM, Barrows FT, Smith CE, Hardy RW.** (2010) Dietary supplementation strategies to improve performances of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fed plant-based diets. *Bull Fish Res Agen* 31, 15–23.
- Seiliez I, Panserat S, Kaushik S, Bergot P.** (2001) Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a delta-6-desaturase-like enzyme in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol., Part B Biochem. Mol. Biol.* 130, 83–93.
- Senger F, Priat C, Hitte C, Sarropoulou E, Franch R, Geisler R, Bargelloni L, Power D, Galibert F.** (2006) The first radiation hybrid map of a perch-like fish: The gilthead seabream (*Sparus aurata* L). *Genomics*, 87:793–800.
- Sessler AM, Ntambi JM.** (1998) Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Journal of Nutrition* 128, 923–926
- Seo JK, Lee MJ, Go HJ, Kim YJ, Park NG.** (2014) Antimicrobial function of the GAPDH-related antimicrobial peptide in the skin of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *Fish Shellfish Immunol.* 36(2):571-81.
- Shashoua VE.** (1977) Brain protein metabolism and the acquisition of new patterns of behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74:1743-1747.
- Shashoua VE.** (1991) Ependymin, a brain extracellular glycoprotein, and CNS plasticity. *Ann NY Acad Sci*, 627:94-114.
- Sheehy T, Sharma S.** (2010) The nutrition transition in Barbados: trends in macronutrient supply from 1961 to 2003. *B J Nutr.* 104:1222-9.
- Shimoda Y, Watanabe K.** (2009) Emerging key roles in the development and function of the nervous system. *Cell Adh Migr*, 3(1): 64–70.
- Sikorski ZE, Kolakowska A.** (2002) Chemical and Functional Properties of Food Lipids. *CRC Press* 400Pág.
- Simopoulos AP.** (1999) Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supply. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 60:421-9.
- Simopoulos AP.** (2002) Genetic variation and dietary response: nutrigenetics/nutrigenomics. *Asia Pacific J Clin Nutr* 11(S6):S117–S128,
- Simopoulos AP.** (2008) The importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *EBM* 233:674-688
- Simopoulos AP.** (2010) Nutrigenetics/nutrigenomics. *Annu Rev Public Health*, 31: 53–68.

- Singh RB, Gupta S, Dherange P, De Meester F, Wilczynska A, Alam SE, Pella D, Wilson DW.** (2012) Metabolic syndrome: a brain disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 90(9): 1171-1183
- Soengas JL, Strong EF, Fuentes J, Veira JAR, Andrés MD.** (1996) Food deprivation and refeeding in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Effects on brain and liver carbohydrate and ketone bodies metabolism. *Fish Physiol. Biochem.* 15, 491–511
- Soler L, Conte MA, Katagiri T, Howe AE, Lee BY, Amemiya C, Stuart A, Dossat C, Poulain J, Johnson J, Di Palma F, Lindblad-Toh K, Baroiller JF, D'Cotta H, Ozouf- Costaz C, Kocher TD.** (2010) Comparative physical maps derived from BAC end sequences of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *BMC Genomics*, 11:636.
- Sorensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V.** (2003) The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *E -co logy Letters*, 6: 1025-1037.
- Souaze F, Ntodou-Thome A, Tran CY, Rostene W, Forgez P.** (1996) Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *BioTechniques*, 21: 280-285.
- Stanley-Samuelson DW.** (1994) The Biological Significance of Prostaglandins and Related Eicosanoids in Invertebrates. *Amer. Zool.* 34(6), 589-598.
- Stein J, Liang P.** (2002) Differential display technology: a general guide. *Cell Mol Life Sci.* 59: 1235-1240.
- Stover PJ.** (2004) Nutritional genomics. *Physiol Genomics*, 16:161-5.
- Stulning TM.** (2003) Immunomodulation by polyunsaturated fatty acids: mechanisms and effects. *Int Arch Allergy Immunol.* 132(4):310-21
- Suto F, Ito K, Uemura M, Shimizu M, Shinkawa Y, Sanbo M, Shinoda T, Tsuboi M, Takashima S, Yagi T, Fujisawa H.** (2005) Plexin-a4 mediates axon-repulsive activities of both secreted and transmembrane semaphorins and plays roles in nerve fiber guidance. *J. Neurosci.* 25 (14): 3628–37.
- Szentirmay MN, Yang HX, Pawar SA, Vinson C, Sawadogo M.** (2003) The IGF2 receptor is a USF2-specific target in nontumorigenic mammary epithelial cells but not in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 278(39):37231-40.
- Tacon AGJ, Metian M.** (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: trends and future prospects. *Aquaculture* 285, 146–158.
- Tanaka N, Zhang X, Sugiyama E, Kono H, Horiuchi A, Nakajima T, Kanbe H, Tanaka E, Gonzalez FJ, Aoyama T.** (2010) Eicosapentaenoic acid improves hepatic steatosis independent of PPARalpha activation through inhibition of SREBP-1 maturation in mice. *Biochem. Pharmacol.* 80: 1601–1612

- Tang YL, Shepherd BS, Nichols AJ, Dunham RA, Chen TT.** (2001) Influence of the environmental salinity on mRNA levels of growth hormone, prolactin and somatolactin in the pituitary of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Mar. Biotechnol.* 3, 205–217.
- Tebbey PW, Van Cleave S, Buttke TM.** (1994) Induction of stearyl-CoA desaturase 2 gene expression correlates with fatty acid changes in phosphatidylcholine. *Biochemistry and Molecular Biology International* 33, 991-1000.
- Tian J, Wu F, Yang C-G, Jiang M, Liu W, Wen H.** (2015) Dietary lipid levels impact lipoprotein lipase, hormone-sensitive lipase, and fatty acid synthetase gene expression in three tissues of adult GIFT strain of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem* 41:1–18
- Tichopad A, Dilger M, Scharz G, Plaffl MW.** (2003) Standardized determination of realtime PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res* 31: 122.
- Tine M, Bonhomme F, McKenzie DJ, Durand J-D.** (2010) Differential expression of the heat shock protein Hsp70 in natural populations of the tilapia, *Sarotherodon melanotheron*, acclimatised to a range of environmental salinities. *BMC Ecology*, 10: 11.
- Tocher DR, Bell JG, Sargent JR.** (1996) Production of eicosanoids derived from 20:4n-6 and 20:5n-3 in primary cultures of turbot (*Scophthalmus maximus*) brain astrocytes in response to platelet activating factor, substance P and interleukin-1 beta. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 115(2), 215-222.
- Tocher DR, Dick JR.** (1999) Polyunsaturated fatty acid metabolism in a cell culture model of essential fatty acid deficiency in a fresh water fish, carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiology and Biochemistry* 21, 257-267.
- Tocher DR, Ghioni C.** (1999) Fatty acid metabolism in marine fish: low activity of fatty acid $\Delta 5$ -desaturation in gilthead seabream (*Sparus aurata*) cells. *Lipids* 34, 433-440
- Tocher DR, Bell JG, Dick JR, Henderson RJ, McGhee, Michell D, Morris PC.** (2000) Polyunsaturated fatty acid metabolism in Atlantic salmon (*Salmo salar*) undergoing parr-smolt transformation and the effects of dietary linseed and rapeseed oils. *Fish Physiology and Biochemistry* 23, 59-73.
- Tocher DR, Dick JR.** (2000) Essential fatty acid deficiency in freshwater fish: the effects of linoleic, α -linolenic, γ -linolenic and stearidonic acids on the metabolism of [1- 14 C] 18:3n-3 in a carp cell culture model. *Fish Physiology and Biochemistry* 22, 67-75.
- Tocher DR, Agaba M, Hastings N, Bell JG, Dick JR, Teale AJ.** (2002) Nutritional regulation of hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition in zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 24, 309-320.

Tocher DR. (2003) Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science* 11(2):107-184.

Tocher DR, Bell JG, Dick JR, Crampton VO. (2003) Effects of dietary vegetable oil on Atlantic salmon hepatocyte fatty acid desaturation and liver fatty acid compositions. *Lipids* 38(7):723-732.

Tocher DR, Zheng XZ, Schlechtriem C, Hastings N, Dick JR, Teale AJ. (2006) Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: Cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl Delta 6 desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Lipids* 41(11), 1003-1016.

Torestensen BE, Oyvind L, Froyland I. (2000) Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) effects of capelin oil, palm oil and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources. *Lipids* 35: 653–664.

Thorsen J, Zhu B, Frengen E, Osoegawa K, Jong PJ, Koop BF, Davidson W, Hoyheim B. (2005) A highly redundant BAC library of Atlantic salmon (*Salmo salar*): an important tool for salmon projects. *BCM Genomics* 6:50

Trautwein EA. (2001) N-3 Fatty acids - physiological and technical aspects for their use in food. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103(1), 45-55.

Trewavas E. (1983) A review of the tilapine fish of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* y *Danakilia*. London British Museum (Natural History).

Trichet VV. (2010) Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research* 41, 356–372.

Trujillo E, Davis C, Milner J. (2006) Nutrigenomics, Proteomics, metabolomics, and the practice of dietetics. *J Am Diet Assoc* 106:403-413.

Turchini GM, Mentasti T, Froiland L, Orban E, Caprino F, Moretti VM, Valfre F. (2003) Effects of alternative dietary lipid sources on performance, tissue chemical composition, mitochondrial fatty acid oxidation capabilities and sensory characteristics in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquaculture* 225, 251-267.

Turchini GM, Torstensen BE, Ng WK. (2009) Fish oil replacement in finfish nutrition. *Reviews in Aquaculture* 1, 10–57.

Turchini GM, Ng WK, Tocher DR. (2011) Fish Oil Replacement and Alternative Lipid Sources in Aquaculture Feeds. Ed. CRC Press, NY

Ulloa PE, Iturra P, Neira R, Araneda C. (2011) Zebrafish as a model organism for nutrition and growth: towards comparative studies of nutritional genomics applied to aquacultured fishes. *Rev Fish Biol Fisheries* 21:649–666

- USDA (U.S. Department of Agriculture) Agricultural Research Service.** (2010) USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23. *Nutrient Data Laboratory*. Available from: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>
- Uyeda K, Yamashita H, Kawaguchi T.** (2002) Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem Pharmacol.* 63(12):2075-80.
- Van Anholt RD, Spanings T, Koven WM, Wendelaar Bonga SE.** (2003) Effects of acetylsalicylic acid on thyroid hormones, prolactins, and the stress response of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 285, 1098–1106
- Van Anholt RD, Spanings T, Koven WM, Wendelaar Bonga SE.** (2004) Dietary supplementation with arachidonic acid in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) reveals physiological effects not mediated by prostaglandins. *General and Comparative Endocrinology* 139, 215–226
- Vera Cruz EM, Brown CL, Luckenbach JA, Picha ME, Bolivar RB, Borski RJ.** (2006) Insulin-like Growth Factor-I cDNA cloning, gene expression and potential use as a growth rate indicator in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 251, 585–595.
- Vicent D, Piper M, Gammeltoft S, Maratos-Flier E, Kahn CR.** (1998) Alterations in skeletal muscle gene expression of ob/ob mice by mRNA differential display. *Diabetes*. 47: 1451-1458.
- Vieira JM, Schwarz Q, Ruhrberg C.** (2007) Selective requirements for NRP1 ligands during neurovascular patterning. *Development* 134 (10): 1833–43
- Vilhelmson OT, Martin SAM, Médale F, Kaushik SJ, Houlihan DF.** (2004) Dietary plant-protein substitution affects hepatic metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Br J Nutr*, 92(1):71–80.
- Visentainer JV, de Souza NE, Makoto M, Hayashi C, Franco MRB.** (2005) Influence of diets enriched with flaxseed oil on the α -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acid in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chemistry* 90, 557-560.
- Wall R, Ross RP, Fitzgerald JF, Stanton C.** (2010) Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition Reviews*, 68(5) 280–289.
- Wanders RJA, Vreken P, Ferdinandusse S, Jansen GA, Waterham HR, van Roermund CWT, Van Grunsven EG** (2001) Peroxisomal fatty acid α - and β -oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochemical Society Transactions* 29, 250-267.

- Wanders RJ.** (2004) Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*; 83(1-2):16-27.
- Wang A, Han G, Wei X, Liu B, Lv F, Feng G, Qi Z, Wang T, Xu P, Yang Z.** (2010) Molecular cloning of fatty acid synthase from GIFT tilapia (*Oreochromis niloticus*): response of its expression to refeeding and different lipid level in diet. *J Fish Sci China* 34:1113–1120
- Wang H. and Gong Z.** (1999) Characterization of two zebrafish cDNA clones encoding egg envelope proteins ZP2 and ZP3. *Biochimica et Biophysica Acta* 1446 156–160
- Wassef EA, Shalaby SH, Wahby OM.** (2012) Effects of dietary vegetable oils on liver and gonad fatty acid metabolism and gonad maturation in gilthead seabream (*Sparus aurata*) males and females. *Aquacul. Int.* 20: 255–281
- Wassef EA, Shalaby SH, Saleh NE.** (2014) Cottonseed oil as a complementary lipid source in diets for gilthead seabream *Sparus aurata* juveniles. *Aquaculture Research*, 46, 2469-2480
- Wassef EA, Shalaby SH, Saleh NE.** (2015) Comparative evaluation of sunflower oil and linseed oil as dietary ingredient for gilthead seabream (*Sparus aurata*) fingerlings. *OCL* 22 (2) A201
- Watanabe T.** (1982) Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B: 3-15
- Watanabe WO, Losordo TM, Fitzsimmons K, Hanley F.** (2002) Tilapia Production Systems in the Americas: Technological Advances, Trends, and Challenges. *Review in Fisheries Science*, Vol. 10, 3 & 4: 465-498.
- Webster CD, Tidwell JH, Goodgame LS, Yancey DH.** (1991) Evaluation of distillers grains with soluble as a protein source in diets for channel catfish. *Aquaculture*, 96:179-190.
- Whitaker HA, McAndrew B, Taggart J.** (2006) Construction and characterization of a BAC library for the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Anim. Genet.*, 37:526.
- Wohlfarth GW, Hulata G, Halevy A.** (1990) Survival, sex ratio and growth of some tilapia species and their interspecific hybrids. *Eur. Aquacult. Soc. Spec. Publ.* 11, 87–101.
- Wong ML, Meandro JF.** (2005). Real-time for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39: 75-85
- Wu JH, Micha R, Imamura F, Pan A, Biggs ML, Ajaz O, Djousse L, Hu FB, Mozaffarian D.** (2012) Omega-3 fatty acids and incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Br Nutr.* 107 Suppl 2:S214-27.
- Wu YV, Rosati RR, Sessa DJ, Brown PB.** (1995) Evaluation of corn gluten meal as a protein source in tilapia diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:1585-1588.

- Xu P, Wang S, Liu L, Thorsen J, Kucuktas H, Liu Z.** (2007) A BAC-based physical map of the channel catfish genome. *Genomics*. 90(3):380-8
- Xu R, Hung SSO, German JB.** (1996) Effects of dietary lipids on the fatty acid composition of triglycerides and phospholipids in tissues of white sturgeon. *Aquaculture Nutrition* 2, 101-109.
- Xue X, Feng CY, Hixson SM, Johnstone K, Anderson DM, Parrish CC, Rise ML.** (2014) Characterization of the fatty acyl elongase (elovl) gene family, and hepatic elovl and delta-6 fatty acyl desaturase transcript expression and fatty acid responses to diets containing camelina oil in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 175:9-22.
- Xue X, Hixson SM, Hori TS, Booman M, Parrish C, Anderson D, Rise M.** (2015) Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver transcriptome response to diets containing Camelina sativa products. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D* 14: 1–15
- Yada T, Nagae M, Moriyama S, Azuma T.** (1999). Effects of prolactin and growth hormone on plasma immunoglobulin M levels of hypophysectomized rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 115: 46-52.
- Yada T, Uchida K, Kajimura S, Azuma T, Hirano T, Grau EG.** (2002) Immunomodulatory effects of prolactin and growth hormone in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Endocrinol*. 173, 483–492
- Yamagishi K, Iso H, Date C, Fukui M, Wakai K, Kikuchi S, Inaba Y, Tanabe N, Tamakoshi A. Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk Study Group.** (2008) Fish, omega-3 polyunsaturated fatty acids, and mortality from cardiovascular diseases in a nationwide community-based cohort of Japanese men and women the JACC (Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risk) Study. *J Am Coll Cardiol*. 16;52(12):988-96.
- Yu TC, Sinhuber RO.** (1976) Growth responses of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to dietary w3 and w6 fatty acids. *Aquaculture* 8, 309-317
- Zagal A, Mazmanci B.** (2011) Oxidative stress response in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to textile mill effluent. *Toxicol Ind Health*. 27(1):81-5.
- Zhang Y, Liu S, Lu J, Jiang Y, Gao X, Ninwichian P, Li C, Waldbieser G, Liu Z.** (2013) Comparative genomic analysis of catfish linkage group 8 reveals two homologous chromosomes in zebrafish and other teleosts with extensive inter-chromosomal rearrangements. *BMC Genomics*, 14:387
- Zheng X, Tocher DR, Dickson CA, Bell JG, Teale AJ.** (2004) Effects of diets containing vegetable oil on expression of genes involved in highly unsaturated fatty acid biosynthesis in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 236, 467-483.

Zheng X, Torstensen BE, Tocher DR, Dick JR, Henderson RJ, Bell JG. (2005) Environmental and dietary influences on highly unsaturated fatty acid biosynthesis and expression of fatty acyl desaturase and elongase genes in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1734, 13-24.

Ziegler EE, Filer LJ. (1996) Present Knowledge in Nutrition. 7 edition. *ILSI Press*. Washington, D.C.

ANEXOS